

Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hans Kretzschmar †

**Toxische Oligomere in der Pathogenese des Morbus
Parkinson - Elektrophysiologische Charakterisierung der
Membraninteraktion und Porenbildung von pathologischen
 α -Synuclein Aggregaten**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität



vorgelegt von

Felix Mathias Schmidt

aus Landsberg am Lech

2014

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Armin Giese

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Harald Steiner

Prof. Dr. med. Michael Ewers

Prof. Dr. med. Jochen Herms

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Johannes Levin

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2014

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Neurodegenerative Erkrankungen	6
1.2 Morbus Parkinson als häufigste Synucleinopathie	7
1.3 Synuclein	9
1.3.1 α -Synuclein	10
1.3.2 Physiologische Lipid-Bindungsmodi und Funktion	12
1.3.3 Pathophysiologische Aggregation	14
1.4 Amyloidogene Proteine und Porenbildung	17
1.5 Membranelektrophysiologie	19
1.5.1 Kondensatorphysik	19
1.5.2 Generierung von Lipid-Doppelschichtmembranen: die <i>Painting</i> -Technik	21
1.5.3 Toxische Porenbildung in Lipid-Doppelschichtmembranen	23
1.6 Zielsetzung	24
2 Material und Methoden	26
2.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem α -Synuclein	26
2.1.1 Transformation von <i>Escherichia Coli</i>	26
2.1.2 Expression von α -Synuclein	27
2.1.3 Qualitätskontrolle	28
2.2 Fluoreszenz-Markierung	29
2.3 Konfokale Einzelmolekülspektroskopie	30
2.3.1 Messaufbau und -bedingungen	30
2.3.2 Analyseverfahren	32
2.3.2.1 Korrelationsanalysen	32
2.3.2.2 FIDA	34
2.3.2.3 SIFT	35
2.3.3 Aggregationsansatz für die Einzelmolekülspektroskopie	36
2.3.4 Pharmakologische Inhibition der Oligomerbildung	37
2.4 Einzelkanal-Elektrophysiologie	37
2.4.1 Herstellung und Charakterisierung von BLMs	37
2.4.2 Aggregationsansatz für die Einzelkanal-Elektrophysiologie	40
2.4.3 Charakterisierung des Effektes von α -Synuclein Oligomeren auf BLMs	41
2.4.4 Charakterisierung in Abhängigkeit von den verfügbaren Kationen	42

2.4.5 Pharmakologische Inhibition der Porenbildung	42
2.5 Biologische Relevanz <i>in vivo</i>	43
2.5.1 Eisenbestimmungen im Hirngewebe	43
2.5.1.1 Transkardiale Perfusion	43
2.5.1.2 Hochdruckveraschung	44
2.5.2 Pharmakologische Inhibition	45
3 Ergebnisse	47
3.1 Herstellung von rekombinantem α -Synuclein	47
3.2 α -Synuclein Oligomere auf Einzelmolekülebene	52
3.3 Einfluss von α -Synuclein Oligomeren auf Lipid-Membranen	53
3.3.1 Etablierung des BLM-Assays	53
3.3.2 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Porendetektion	54
3.3.3 Charakterisierung des Effektes auf elektrophysiologische Membraneigenschaften	55
3.3.4 Detaillierte Analyse der Schaltereignisse bei +80 mV	58
3.3.5 Abhängigkeit des Leitwertes vom verfügbaren Kation	61
3.3.6 Pharmakologische Inhibition der Porenbildung	62
3.4 Biologische Relevanz <i>in vivo</i>	63
3.4.1 Aggregationsbedingungen	63
3.4.2 Pharmakologische Inhibition	64
4 Diskussion	66
4.1 Charakterisierung des Effektes von α -Synuclein Oligomeren auf Lipid-Doppelschichtmembranen	67
4.2 Oligomere Porenbildung als möglicher Pathomechanismus des Nervenzelltodes	72
4.3 Biologische Relevanz	75
4.3.1 Aggregationsbedingungen	75
4.3.2 Pharmakologische Inhibition	77
5 Zusammenfassung	79
6 Abbildungsverzeichnis	83
7 Tabellenverzeichnis	85
8 Literaturverzeichnis	86
9 Danksagung	100

Sein Blick ist vom Vorübergehen der Stäbe
So müd geworden, dass er nichts mehr hält.
Ihm ist, als ob es tausend Stäbe gebe
Und hinter tausend Stäben keine Welt.

Der weiche Gang geschmeidig starker Schritte,
Der sich im allerkleinsten Kreise dreht,
Ist wie ein Tanz von Kraft um eine Mitte,
In der betäubt ein großer Wille steht.

Nur manchmal schiebt der Vorhang der Pupille
Sich langsam auf, dann geht ein Bild hinein.
Geht durch der Glieder angespannte Stille
Und hört im Herzen auf zu sein.

1 Einleitung

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Unter neurodegenerativen Erkrankungen versteht man Erkrankungen des Nervensystems in deren Verlauf es zum progressiven Verlust von Nervenzellen kommt, was zu den jeweils krankheitsspezifischen neurologischen Symptomen führt, häufig Demenz und Bewegungsstörungen [1].

Molekularpathologisch lassen sich die jeweiligen Erkrankungen meist durch die Bildung und Ablagerung von krankheitsspezifischen, amyloiden Proteinaggregaten klassifizieren. So kommt es bei den Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien wie der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit zur Ablagerung von pathologischen Aggregaten des Prion-Proteins und beim Morbus Huntington lässt sich aggregiertes Huntingtin nachweisen. Die häufigste neurodegenerative Erkrankung des Menschen, der Morbus Alzheimer, zeichnet sich durch die Aggregation und intrazelluläre Ablagerung von Tau-Proteinen aus, sowie durch die extrazelluläre Ablagerung von Amyloid- β -Peptid-Aggregaten. Bei sog. Synucleinopathien dagegen kommt es zur zytoplasmatischen Aggregation und Ablagerung von α -Synuclein [2, 3].

Allen diesen Erkrankungen ist gemein, dass bei der Entstehung der fibrillären Amyloid-Aggregate, intermediäre Zwischenstufen, sog. Oligomere entstehen. Diese scheinen die im Wesentlichen toxische Proteinaggregatspezies darzustellen und die eigentliche krankheitsassoziierte Nervenzellschädigung zu vermitteln [4, 5]. Der zugrunde liegende Mechanismus, durch den die Proteinaggregation den Nervenzelltod bedingt, ist jedoch noch Gegenstand kontroverser Diskussionen.

1.2 Morbus Parkinson als häufigste Synucleinopathie

Synucleinopathien bezeichnet eine Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, bei denen es im Verlauf zur Aggregation und Ablagerung von α -Synuclein kommt. Die bekanntesten Vertreter dieser Gruppe sind der Morbus Parkinson (PD), die multiple Systematrophie (MSA) und die Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB). Während es bei dem PD und der DLB zur Ablagerung der charakteristischen Lewy-Körperchen (LB) in Neuronen kommt, werden bei der MSA sog. gliale zytoplasmatische Einschlüsse gebildet [3, 6-9].

PD ist die häufigste neurodegenerative Bewegungsstörung des Menschen und nach dem Morbus Alzheimer die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung des Gehirns. In Europa geht man von einer durchschnittlichen Prävalenz von 0,1 bis 0,3 %, für die über 65-jährige Bevölkerung sogar von 1 bis 3,5 % aus. Hinsichtlich der Geschlechterpräferenz gibt es eine leichte männliche Dominanz (1,5:1). Derzeit leiden in Deutschland etwa 200.000 Menschen an PD und die Anzahl der jährlichen Neuerkrankungen wird auf 5 bis 346 pro 100.000 Menschen geschätzt [8, 10-14].

Neuropathologisch ist der PD durch den Zelltod v.a. neuromelaninhaltiger, dopamin-erger Neurone in der Substantia nigra pars compacta und die zytoplasmatische Ablagerung von LBs in den betroffenen Nervenzellpopulationen charakterisiert. Zusätzlich gibt es auch α -Synuclein-positive Ablagerungen in Neuriten, sog. Lewy-Neuriten (LNs; siehe Abb. 1.1) [15-18].

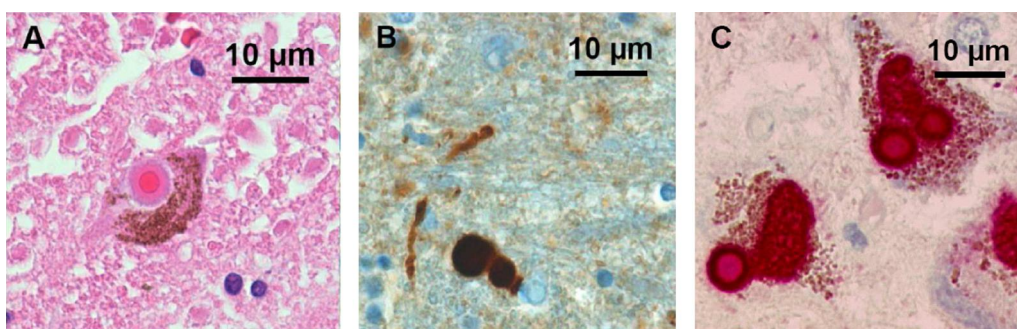


Abb.1.1: Lewy-Körperchen und –Neuriten als histopathologische Charakteristika des Morbus Parkinson. **A** Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) eines Neurons im Hirnstamm mit einem intrazellulären, zytoplasmatischen LB. **B** Immunhistochemische Färbung von LBs und einem LN mit 15G7, einem monoklonalen Antikörper gegen humanes α -Synuclein (ABC-Reaktion, Farbsubstrat: DAB). **C** Immunhistochemische Färbung von LBs mit 15G7 (APAAP-Reaktion, Farbsubstrat: Neufuchsin; Bilder: Tobias Högen, LMU München).

Während der Nervenzellverlust in der Substantia nigra am auffälligsten ist, korreliert die Verteilung von LBs und LNs im Gehirn mit dem Stadium der Erkrankung. Sind sie in der präklinischen Phase im motorischen Kern des Nervus vagus bzw. im Kern des Nervus glossopharyngeus und im anterioren olfaktorischen Nucleus nachweisbar, so findet man sie mit fortschreitendem Krankheitsstadium innerhalb des Hirnstammes, im Mittelhirn, im entorhinalen Cortex und schließlich in verschiedenen neocorticalen Gehirnarealen [19].

Durch den Zelltod dopaminergener Neurone entsteht ein Mangel an dem Neurotransmitter Dopamin, der physiologisch eine regulierende Funktion im subcorticalen nigro-striatalen System hat. Der Dopaminmangel führt zu einer Dysfunktion der sensomotorischen Basalganglienschleife und schließlich, nach dem Verlust von 50-60 % der dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra zum klinischen Erscheinungsbild des PD. Dazu gehören zunächst Störungen der Riechfunktion, des Schlafverhaltens, des Vegetativums und Depressionen, schließlich auch kognitive Defizite und die typischen Bewegungsstörungen, wie Muskelstarre (Rigor), verlangsamte Bewegungen (Bradykinese) bis hin zur Bewegungslosigkeit (Akinese), ein Ruhetremor mit einer Frequenz von 4-6 Hz und posturale oder Haltungsinstabilität [20].

Der Mechanismus des Nervenzelltods während der Pathogenese ist bis heute ungeklärt. Eine direkte Exposition mit Herbiziden, Pestiziden oder Neurotoxinen kann z.B. durch Entkopplung der Atmungskette zum Verlust von dopaminergen Neuronen führen, was die Symptome des PD auslöst [21, 22].

Darüber hinaus sind 13 Gen-Loci beschrieben (Park 2 bis 13), die mit der familiären Form des PD assoziiert werden, in denen Mutationen und Deletionen zur Dysfunktion zellulärer Systeme führen. Dazu gehören Proteasom, Mitochondrien, oder die Störung bestimmter intrazellulärer Signalwege. Durch den entstehenden Mangel an Energieträgern, oxidativen Stress und gestörten Proteinabbau wird vermutlich die Neurodegeneration initiiert oder beschleunigt [23-25].

Darüber hinaus wurden inzwischen vier Punktmutationen des Park1-Gens beschrieben, das für α -Synuclein kodiert, die mit der autosomal-dominant vererbten Form des PD assoziiert werden. Darüber hinaus können höhere Gendosen, bedingt durch Duplikationen und Triplikationen des Park1-Gens die Erkrankung auslösen [26-29].

Als medikamentöse Behandlungsstrategie ist die Gabe von Levodopa zu nennen, das nach Überwinden der Blut-Hirn-Schranke u.a. von den dopaminergen Neuronen zu Dopamin verstoffwechselt wird, und so den durch die Neurodegeneration verursachten Dopaminmangel ausgleichen soll. Meist wird zusätzlich die Catechol-O-Methyl-Transferase durch Medikamente (sog. COMT-Hemmer) kompetitiv gehemmt, um den Abbau von Dopamin und Levodopa zu deren inaktiven Metaboliten zu verlangsamen. Neben der Gabe von Dopamin und der Hemmung von dessen Abbau, können alternativ auch Dopaminagonisten verabreicht werden. Diese können die Dopamin-Rezeptoren durch Bindung stimulieren und so eine dem Dopamin analoge Wirkung erzielen [30].

Eine neurochirurgische Therapiemöglichkeit stellt die sog. Tiefe Hirnstimulation dar. Hierbei wird dem Patienten in einer stereotaktischen Gehirnoperation ein programmierbarer Impulsgenerator, ein sog. Hirnschrittmacher, eingesetzt. Dieser projiziert zum Globus Pallidus, dem Nucleus Subthalamicus, oder dem Thalamus, um dort die krankheitsbedingten, überaktiven Fehlimpulse zu unterdrücken, die die Aktivierung des motorischen Cortex hemmen und somit die motorischen Defizite bedingen [31].

Allen bisher verfügbaren Behandlungsstrategien ist gemein, dass sie lediglich symptomatische, aber keine ursächlichen, krankheitsmodulierenden Therapien darstellen, da der eigentliche Pathomechanismus bis heute ungeklärt ist.

1.3 Synuclein

Zu den Synuclein-Proteinen gehören drei Homologe, das α -, β - und γ -Synuclein, die zwischen 127 und 140 Aminosäuren lang sind und dabei eine zu 55-62 % identische Sequenz aufweisen [9, 32]. Allen ist gemein, dass sie in hohem Maße im zentralnervösen System expremiert werden, und in geringerem Maße auch in anderen Organen, wie Skelettmuskulatur, Herz, Niere oder Pankreas [32-34].

Bei der biochemischen Analyse amyloider Plaques von Alzheimer Patienten wurde ein 35 Aminosäuren langes Peptid als „non-amyloid β component of AD amyloid plaques“ (NAC) beschrieben. Dessen Vorläufer („non-amyloid β component precursor“; NACP) wurde in Antikörperstudien gegen helicale Filamente, die aus dem Gehirn von Alzheimer Patienten aufgereinigt wurden als α -Synuclein, und ein

weiteres, Phosphoneuroprotein-14 genanntes Protein als β -Synuclein identifiziert [35, 36]. Die Sequenz von γ -Synuclein wurde zunächst als „breast cancer specific gene 1“ (BCSG1) beschrieben, da das Protein in hohem Maße in Brustdrüsenkrebsgewebe expremiert wird. Aufgrund der großen Sequenzähnlichkeit zu den anderen beiden Vertretern der Synucleinproteinfamilie, wurde es nachträglich jedoch umbenannt [9, 32, 37].

Die Detektion von α -Synuclein als Hauptkomponente neuronaler (LBs, LNs) und glialer Einschlusskörperchen (vgl. 1.2, siehe Abb. 1.1) macht es in besonderem Maße zum Forschungsgegenstand auf dem Gebiet der Neurodegeneration in der Pathogenese von Synucleinopathien [3, 6-9].

1.3.1 α -Synuclein

α -Synuclein wurde erstmals aus den präsynaptischen Nervenendigungen des elektrischen Organs des Zitterrochens *Torpedo californica* aufgereinigt, wo es als mit cholinergen synaptischen Vesikeln assoziiert beschrieben wurde [38]. Auch spätere Studien zeigten eine Co-Lokalisation mit synaptosomalen Membranen oder synaptischen Vesikeln [39-41]. Im zentralen Nervensystem macht es ca. 0,5-1 % des zytoplasmatischen Gesamtproteingehalts aus und kommt durch alternatives *splicing* in drei bekannten Isoformen vor [34, 42]. α -Synuclein-126 entsteht durch Deletion der Aminosäuren 41-54 im Exon 3, und α -Synuclein-112 durch Deletion der Aminosäuren 103-130 im Exon 5.

Die *full-length* Form, das α -Synuclein-140 ist die bekannteste Isoform. Es ist 140 Aminosäuren lang, ca. 14 kDa schwer, gut löslich und in nativem Zustand ungefaltet [42]. Es lässt sich im Wesentlichen in drei Abschnitte untergliedern, die N-terminale Region, die NAC-Region und die C-terminale Region (siehe Abb. 1.2).

Die N-terminale Region umfasst die Aminosäuren 1-60 und besteht im Wesentlichen aus vier unvollständigen, 11 Aminosäuren langen Wiederholungssequenzen mit dem Konsensusmotiv KTKEGV. Weitere Wiederholungen dieses Motivs finden sich zusätzlich am Übergang zur und in der NAC-Region selbst (siehe Abb. 1.2 A). Alle vier mit der familiären Form des PD assoziiert beschriebenen Punktmutationen (A30P, E46K, H50Q und A53T) finden ebenfalls in der N-terminalen Region statt [26-29].

Die NAC-Region umfasst die Aminosäuren 61-95, jene 35 Aminosäuren, deren Peptid als die „non-amyloid β component of AD amyloid plaques“ (NAC; vgl. 1.3) beschrieben wurde. Die NAC-Region weist v.a. hydrophobe Aminosäuren auf und scheint eine wesentliche Rolle für das Aggregationsverhalten von α -Synuclein zu spielen: β -Synuclein unterscheidet sich von α -Synuclein im Fehlen von 11 Aminosäuren (73-83) innerhalb der NAC-Region, und weist im Gegensatz zu α -Synuclein keinerlei Tendenz zur Selbstaggregation *in vitro* auf [43]. Im Gegenteil scheint die Co-Inkubation von β - mit α -Synuclein dieses sogar an der Aggregation zu hindern. Auch γ -Synuclein weist u.a. eine veränderte NAC-Region auf und bildet nur sehr eingeschränkt amyloide, fibrilläre Ablagerungen [44-46]. Die NAC-Region ist dagegen allein und in Co-Inkubation mit α -Synuclein-140 in der Lage, die Aggregation zu induzieren. Die Aminosäuren 73-83, die beim α -Synuclein eine hydrophobe Peptidsequenz bilden, scheinen also offenbar β -Faltblattfördernd zu wirken und somit essentiell für die amyloidogenen Eigenschaften des Proteins zu sein. Deletionen dieses Bereiches, oder der Austausch hydrophober durch hydrophile Aminosäuren, führen zum Verlust dieser Eigenschaften [47].

Die aggregativen Eigenschaften dieser Region, in der sich die Sequenz VGGAVVTG in den Aminosäuren 66-73 findet könnten auch eine Verbindung zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen darstellen, die auf eine pathologische Proteinaggregation zurückzuführen sind. Während das Prion-Protein die Sequenz AAGAVVGG (AS 117-124) aufweist, findet man bei A β die Sequenz VGGVVIAT (AS 36-42). Beides sind quasi Konsensusmotive zu der Sequenz in der NAC-Region von α -Synuclein [48].

Der C-terminale Bereich von α -Synuclein umfasst die Aminosäuren 96-140 und ist durch saure Aminosäurereste bei physiologischem pH-Wert negativ geladen (Nettoladung des Proteins: -10). Durch Tyrosine an den Positionen 125, 133 und 136, sowie Serin an Position 129 besitzt er zudem potentielle Phosphorylierungs- und Nitrierungsstellen, an denen die Aggregation durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden kann [49-51]. Was die amyloidogenen Eigenschaften der Region angeht, gibt es sowohl Hinweise darauf, dass C-terminal trunkiertes α -Synuclein eine stärkere Tendenz zur Selbstaggregation aufweist, als auch dass der negativ geladene C-Terminus bei der durch Metallionen induzierten Aggregation eine Rolle spielt [52-54].

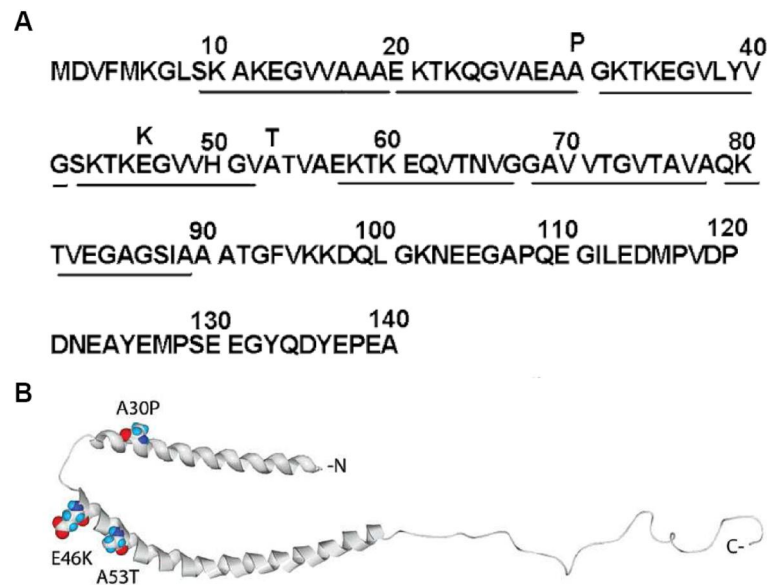


Abb. 1.2: Aminosäuresequenz und räumliche Struktur der *full-length* Isoform des humanen α -Synucleins. **A** Aminosäuresequenz mit den unvollständigen Wiederholungen des KTKEGV-Konsensusmotivs und drei der vier humanpathogen interessanten Punktmutationsstellen [55]. **B** Dreidimensionale Darstellung des α -Synucleins mit den membranassoziierten, N-terminalen amphipatischen α -Helices und dem ungeordneten C-Terminus, sowie drei der humanpathogen interessanten Punktmutationstellen [56].

1.3.2 Physiologische Lipid-Bindungsmodi und Funktion

In Gegenwart von negativ geladenen Lipid-Wasser-Grenzflächen, wie Lipid-Vesikeln oder -Membranen kommt es zu einer Konformationsänderung der N-terminalen Region von α -Synuclein. Dabei entstehen aus der in wässriger Lösung vorliegenden, ungeordneten Sekundärstruktur zwei amphipatische α -Helices, vergleichbar mit den Lipid-Bindungsdomänen von Apolipoproteinen. Der C-Terminus verbleibt dagegen in ungeordneter Konformation (siehe Abb. 1.2 B) [57].

Die Affinität von monomerem, physiologischem α -Synuclein an Lipid-Membranen zu binden, hängt dabei stark von der Oberflächenkrümmung und der Zusammensetzung der Lipide ab: weisen diese eine negative Ladung und eine starke Krümmung auf, ist die Bindungsaffinität hoch. α -Synuclein bindet auch an kleine unilamellare Liposomen (engl.: small unilamellar vesicles, SUVs), die aus zwitterionischen Lipiden bestehen (z.B. Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin, DPPC) und sich im sog. Gel-Zustand befinden (engl.: gel-state), deren Oberfläche dann aufgrund der starken Krümmung kleine Defekte aufweisen. Die Bindungsaffinität zu SUVs aus zwitterionischen Lipiden, die eine ungestresste, defektfreie Oberfläche aufweisen,

sich also im flüssig-kristallinen Zustand befinden (engl.: liquid-crystalline state, z.B. aus Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin, POPC) ist dagegen gering [56, 58, 59].

Durch die Bindung an Membranen mit starker Krümmung und gestressten Oberflächen, sind α -Synuclein Monomere anscheinend in der Lage, die Defekte zu verschließen und dadurch eine Fusion von Membranen an diesen zu verhindern. Tatsächlich liegt α -Synuclein in präsynaptischen Endigungen zu etwa 15 % membrangebunden vor [60, 61].

Aufgrund dieser spezifischen Bindungseigenschaften und der Lokalisation in synaptischen Nervenendigungen liegt eine physiologische Funktion von α -Synuclein im Kreislauf und Transport synaptischer Vesikel nahe. Dazu könnten die Stabilisierung synaptischer Membranen und die Regulierung des synaptischen Vesikelpools gehören [57, 62, 63]. Über die Freisetzung der gespeicherten Transmitter könnte es zudem an der synaptischen Übertragung beteiligt sein.

Für die Vesikelfreisetzung konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von α -Synuclein die Verschmelzung und Freisetzung von Vesikeln an die präsynaptische Membran inhibieren kann. Eine Reduzierung des synaptischen α -Synucleins durch Antisense-Oligonukleotide bewirkt dagegen eine verminderte Anzahl der nicht an die synaptische Membran gebundenen Vesikel. Des Weiteren zeigen transgene Mäuse mit einem α -Synuclein-Knockout eine gesteigerte Dopaminfreisetzung bei elektrischer Reizung striataler Neurone. α -Synuclein kann zudem die präsynaptischen Dopamintransporter binden und durch Translokation an die Membranoberfläche die Dopaminaufnahme fördern. Insgesamt scheint α -Synuclein daher eine aktivitätsabhängige, regulatorische Funktion in der striatalen Neuro-transmission zu erfüllen [64-67].

Darüber hinaus sind aber über 50 weitere Bindungspartner für α -Synuclein beschrieben, darunter auch die Phospholipase D2 (PLD2). Diese ist nahe der Plasmamembran lokalisiert und ist durch Spaltung von Phosphatidylcholin u.a. in die Endozytose involviert. α - und β -Synuclein scheinen die PLD2 durch hoch affine Bindung zu inhibieren und dadurch wiederum regulatorisch auf synaptische Lipid-Membranen zu wirken [9, 68, 69]. Die Fähigkeit zur Bindung an Lipasen und Lipid-Membranen scheint wiederum u.a. durch die Phosphorylierung reguliert zu werden: durch Casein Kinase I oder G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen wird α -Synuclein an Serin 129 phosphoryliert und das Bindungsverhalten dadurch moduliert [49, 50].

Ein weiterer Bindungspartner, der für die Rolle von α -Synuclein im Nervenzelltod interessant zu sein scheint, ist das Chaperon 14-3-3, mit dem sich α -Synuclein eine 40 % Sequenzübereinstimmung in der N-terminalen Region teilt. Das zytosolische 14-3-3 verhindert durch Antagonisierung des Bcl2-associated death promoter (BAD) den Nervenzelltod. BAD stellt ein Mitglied der Bcl2-Genfamilie dar, das in der Initialisierung der Apoptose involviert ist. Hier werden für α -Synuclein unterschiedliche Wirkmechanismen diskutiert: zum einen könnte es durch Ausbildung eines Proteinkomplexes mit 14-3-3 zur Sequestrierung des anti-apoptotischen Faktors kommen, was eine zytotoxische Wirkung haben könnte [70-73]. Auf der anderen Seite scheint α -Synuclein auch eine Hilfs-Chaperon-Wirkung im Cystein-Strang-Protein(CSP α)-SNARE Signalweg zu erfüllen, der an der Vesikelfreisetzung an der präsynaptischen Membran beteiligt ist. Transgen α -Synuclein exprimierende Mäuse, die gleichzeitig einen CSP α -Knockout haben, zeigen eine deutlich reduzierte Letalität und eine weniger progressive Neurodegeneration. Dabei scheint α -Synuclein in der Regulation und dem Aufbau von SNARE-Komplexen involviert zu sein, die wiederum an der Vesikelfreisetzung an der präsynaptischen Membran beteiligt sind [74]. Eine mögliche neuroprotektive Funktion von α -Synuclein wird auch durch die Tatsache suggeriert, dass monomeres α -Synuclein die Lipidoxidation verhindern kann und durch Inhibition der Mitogen-aktivierten c-jun N-terminalen Kinase oxidativem Stress vorbeugt [75].

1.3.3 Pathophysiologische Aggregation

Die Aggregation von Monomeren amyloidogener Proteine zu den krankheitsspezifischen fibrillären Ablagerungen scheint über kleinere intermediäre Zwischenstufen abzulaufen. Diese als Protofilamente, Protofibrillen oder Oligomere bezeichneten Intermediate scheinen auch die wesentliche toxische Aggregatspezies darzustellen, über die der Nervenzelltod in der Pathogenese vermittelt wird [4, 25, 76-79]. Die lichtmikroskopisch detektierbaren intrazellulären Ablagerungen (LBs und LNs, vgl. 1.2, siehe Abb. 1.1), die aus fibrillärem α -Synuclein bestehen und das histopathologische Charakteristikum der Erkrankung darstellen, könnten demnach eher eine Art Schutzmechanismus der lebenden Zellen sein, um neurotoxische Aggregate zu sequestrieren und so dem Zelltod vorzubeugen. Unter der Annahme, dass sich α -Synuclein Monomere, verschiedene Spezies an Oligomeren und Fibrillen

in einem dynamischen Gleichgewicht befinden, würden allerdings auch die intrazellulären Ablagerungen eine potentielle Gefahr darstellen. Zum einen könnten die zytotoxischen Oligomere selbst aus diesen dissoziieren, zum anderen könnten kleinere, selbst nicht zytotoxische Aggregate auf das physiologische Monomer als Aggregationskeime wirken (engl.: seeded aggregation) [80-82]. Dass eine Überexpression von α -Synuclein zur Schädigung von Zellorganellen führt und den Zelltod auslösen kann, ohne dass es dabei zu einer detektierbaren Bildung fibrillärer Ablagerungen kommt, ist dabei ein Hinweis auf die neurotoxische Wirkung von Oligomeren [83, 84]. Darüber hinaus weisen α -Synuclein Oligomere strukturelle Gemeinsamkeiten mit den Oligomeren krankheitsspezifischer Proteine anderer neurodegenerativer Erkrankung auf, wie dem Amyloid β -Peptid oder dem Prion-Protein. Das könnte wiederum auf einen gemeinsamen Mechanismus der Neurodegeneration in der Pathogenese der entsprechenden Erkrankungen hindeuten [4, 85].

Für die Entstehung einer neurotoxischen Aggregatspezies scheinen dreiwertige Metallionen eine entscheidende Rolle zu spielen. *In vitro* begünstigen Aluminium-, v.a. aber dreiwertige Eisenionen (Fe^{3+}) die Bildung einer distinkten Aggregatspezies, die die prä- und postsynaptische Transmission in Primärkulturen corticaler Neurone steigert, zu Calcium-Dyshomeostase und zum Zelltod führt. Auch durch Zugabe von Fe^{3+} ins Zellkulturmedium konnte die Oligomerisierung von intrazellulärem α -Synuclein gefördert und die Zelltoxizität gesteigert werden [86-89]. Interessanterweise wird die Bildung der eiseninduzierten Oligomere über Beeinflussung der Fenton-Reaktion auch durch oxidativen Stress positiv beeinflusst [90]. Die so gebildeten Oligomere zeigen auch ein gegenüber dem physiologischen Monomer verändertes Lipid-Bindungsverhalten: bindet das Monomer nicht an defektfreie Membranen aus zwitterionischen Lipiden (z.B. POPC, vgl. 1.3.2), scheinen eiseninduzierte Oligomere unabhängig von Ladung, Lipidzusammensetzung, Oberflächenkrümmung und -beschaffenheit (d.h. mit Oberflächendefekten, oder ungestresst) hoch affin an Membranen binden zu können. Darüber hinaus scheinen POPC-Vesikel auch die Bildung jener α -Synuclein Oligomere positiv zu beeinflussen, die bevorzugt von ihnen gebunden werden [56, 59]. Beides ist gerade unter dem Gesichtspunkt eines möglichen Pathomechanismus der Neurodegeneration interessant, da Zellorganellen wie das endoplasmatische Retikulum oder Mitochondrien Membranen aufweisen, die zu etwa 40 % aus Phosphatidylcholin-

Lipidstrukturen bestehen [91]. Eine Schädigung der Membranen durch Bindung der pathologischen Aggregate und die damit einhergehende Inaktivierung der Zellorganellen könnten z.B. durch Störung der Calcium-Homeostase einen Mechanismus des Zelltodes darstellen [92].

Der Einfluss von Eisen auf die Entstehung pathologischer Proteinaggregate *in vitro* und in Zellkultur ist insofern bemerkenswert, als dass Eisen eine relevante Rolle in der Entstehung des PD zu spielen scheint. Die Hirnregionen, die beim PD am stärksten von der Neurodegeneration betroffen sind, sind die Substantia nigra und der Locus coeruleus des Hirnstammes. Beide weisen hohe Konzentrationen an Neuromelanin auf, welches reaktive Metallionen, v.a. Eisenionen bindet und sequestriert. PD-Patienten zeigen *post mortem* nicht nur einen Anstieg des Eisenspiegels im Gehirn, der mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert, sondern auch eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen zwei- und dreiwertigem Eisen in Richtung einer höheren Fe^{3+} -Konzentration [93-95]. Eine gesteigerte Eisenablagerung im Gehirn ist indes schon frühzeitig mittels bildgebender Verfahren wie der Magnetresonanztomographie beim Patienten nachweisbar, und scheint als frühes Ereignis in der Pathogenese der Neurodegeneration voranzugehen [96-99]. Steigt die Eisenkonzentration normalerweise in den ersten 40 Lebensjahren von ca. 20 ng/mg auf über 200 ng/mg an und bleibt dann bis ins hohe Alter stabil, steigt sie bei PD-Patienten um bis zu 35 % zusätzlich an [95]. Dementsprechend haben Eisenchelatoren in PD-Modellen, die auf einer Behandlung mit Proteasominhibitoren oder Neurotoxinen wie 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) oder 6-Hydroxydopamin beruhen, eine protektive Wirkung auf die Neurodegeneration in der Substantia nigra gezeigt [100-104].

Außer der direkten Beeinflussung der Aggregation *in vitro*, möglicherweise durch Verminderung der elektrostatischen Abstoßung der negativ geladenen Monomere (vgl. 1.3.3), könnten Metallionen in Zellkultur zusätzlich durch Induktion oxidativen Stresses direkt Zellorganellen und -membranen schädigen [54, 90, 95, 105].

1.4 Amyloidogene Proteine und Porenbildung

Eine Möglichkeit, wie α -Synuclein Oligomere ihre zelltoxische Wirkung vermitteln könnten, ist die Interaktion mit dem Proteasomsystem. Durch Hemmung des regulären Proteinabbaus kommt es zur Anreicherung von Proteinen und Spaltprodukten in der Zelle, was u.a. auch zu einem erhöhten oxidativen Stress innerhalb der Zelle führen kann. Dadurch könnten wiederum direkt Zellorganellen geschädigt werden [54, 90, 95, 105-107]. Eine alternative Hypothese, die in neueren Studien diskutiert wird, ist die Einlagerung der Oligomere in Lipid-Membranen, die zur Bildung ionendurchlässiger Poren führen könnte [108-114]. Eine Permeabilisierung von Zellmembranen, Zellorganellen oder Vesikeln könnte zur Dysfunktion der Zelle führen, und z.B. durch einen unphysiologischen Ionenstrom entlang des über Membranen herrschenden Konzentrationsgradienten und den passiven Nachstrom von Wasser der nekrotische Zelltod durch osmotischen Druck bedingt werden. Tatsächlich konnte für diverse krankheitsassoziierte Proteine gezeigt werden, dass diese oligomere Intermediate bilden, die eine ringförmige, porenähnliche Struktur aufweisen: sowohl für das die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit auslösende Prion-Protein, für die polyglutaminhaltigen Proteine, die beim Morbus Huntington relevant sind, für das mit dem Morbus Alzheimer assoziierte Amyloid β -Peptid, als auch für α -Synuclein wurde gezeigt, dass sie *in vitro* ringförmige Oligomere bilden können [81, 109, 115, 116]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese Oligomere Lipid-Membranen permeabilisieren können, bzw. calcium-durchlässige Kanäle in Zellmembranen bilden und so die Calcium-Homeostase stören können [112, 117]. Im Fall von α -Synuclein wurde für zwei der human-pathogen interessanten Mutationen, A30P und A53T, beschrieben, dass sie sowohl ringförmige Oligomere bilden [109, 111, 113], als auch Lipidvesikel permeabilisieren können [108, 110]. Darüber hinaus wurde für das Wildtyp-Protein beschrieben, dass eiseninduzierte Oligomere ebenfalls ringförmige Strukturen bilden (siehe Abb. 1.3), ein verändertes Lipid-Bindungsverhalten aufweisen (vgl. 1.3.3), Lipidvesikel permeabilisieren können und den Stromfluss über planare Lipid-Membranen erhöhen können [59, 81, 86, 118]. In Primärkulturen corticaler Neurone steigern sie die prä- und postsynaptische Transmission, führen ebenfalls zu Calcium-Dyshomeostase und zum Zelltod [89]. Darüber hinaus konnten im Gewebe von an PD oder MSA erkrankten Patienten

ringförmige, porenähnliche α -Synuclein Oligomere detektiert werden [119-121]. Neben der möglichen direkten Bedingung der Nekrose und der unter 1.3.2 beschriebenen Beteiligung an der Apoptose, könnte α -Synuclein den programmierten Zelltod auch durch Bildung einer Calcium-durchlässigen Pore in der Mitochondrien-Membran auslösen. Dadurch könnte quasi ein offener „mitochondrial permeability transition pore“-Komplex simuliert wird, welcher wiederum an der Auslösung der Apoptose-Kaskade beteiligt ist [122].

Noch ungeklärt ist, welcher Art die Schädigung der Lipid-Membranen ist, die aus der Bindung der pathologischen Aggregate resultiert. Zum einen gibt es Hinweise darauf, dass die krankheitsspezifischen Oligomere zu einer diffusen, unspezifischen Schädigung führen, etwa einem Ausdünnen oder Brechen der Membran [84, 123, 124]. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass die Schädigungen ein spezifisches Verhalten zeigen, was z.B. die Durchlässigkeit für bestimmte Ionen oder den resultierenden Stromfluss über die Membran angeht, was auf Eigenschaften ähnlich denen von Kanal-Proteinen hindeuten würde [86, 117]. Durch eine detaillierte elektrophysiologische Charakterisierung des Effektes von Oligomeren auf die Membranen könnte zum einen das Verständnis des möglichen Pathomechanismus verbessert werden, zum anderen könnte die Zielstruktur „toxisches Oligomer“ auch eine charakterisierbare Eigenschaft erhalten, die zur Entwicklung kausaler, krankheitsmodulierender Therapeutika herangezogen werden könnte.

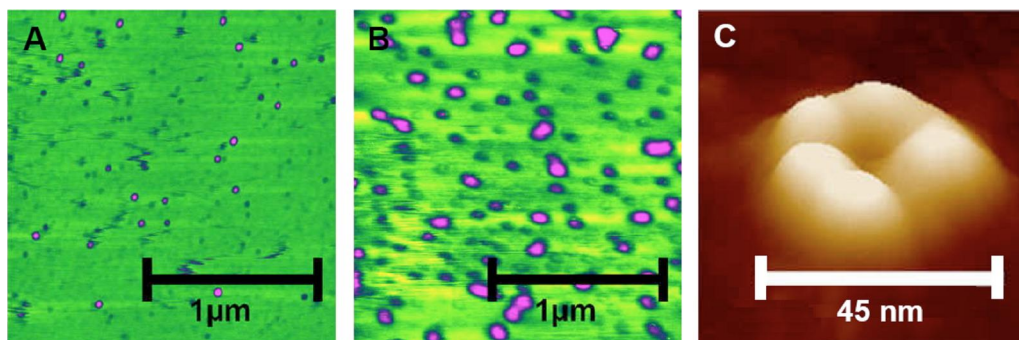


Abb. 1.3: Rasterkraftmikroskopie (AFM)-Aufnahmen von α -Synuclein Oligomeren. **A** AFM-Aufnahme von kleinen, mit organischen Lösungsmitteln induzierten α -Synuclein Oligomeren [86]. **B** In Gegenwart von organischen Lösungsmitteln und dreiwertigen Metallionen bilden sich große SDS-resistente Oligomere [86]. **C** Diese bilden ringförmige, porenähnliche Strukturen [81].

1.5 Membranelektrophysiologie

Biologische Membransysteme trennen als nicht- oder schwachleitende, nicht-metallische Substanzen effizient Reaktionsräume (also z.B. Zellinneres und -äußeres) und damit die jeweils darin enthaltenen Ladungsträger (z.B. Natrium-, Kalium- oder Calciumionen) voneinander. Die Speicherung dieser Ladungen auch entgegen eines Konzentrationsgradienten, d.h. eine Verhinderung des passiven Austausches ist Grundlage der physiologischen Funktion von Zellen oder deren Organellen. So wären die Funktion der Atmungskette innerhalb der Mitochondrien, oder eine Weiterleitung von Aktionspotentialen entlang der Nervenfasern und damit die Reizübertragung auch zwischen den Nervenzellen ohne die Trennung von Ladungsträgern nicht möglich [125].

In erster physikalischer Näherung können Membransysteme daher als Plattenkondensatoren beschrieben werden. Diese speichern ebenfalls Ladungen durch Trennung mittels eines nicht leitenden Dielektrikums, in diesem Fall meistens Luft. Da Plattenkondensatoren durch feste physikalische Kenngrößen beschrieben werden können, können diese zur Charakterisierung des Effektes von Oligomeren auf Membranen herangezogen werden [126, 127].

1.5.1 Kondensatorphysik

Zur Beschreibung von Plattenkondensatoren und damit Membransystemen ergeben sich im Wesentlichen zwei elektrophysikalische Messgrößen, die elektrische Kapazität C und der elektrische Widerstand R , bzw. dessen Kehrwert, der elektrische Leitwert G .

Die elektrische Kapazität ist ein Maß für die Fähigkeit des Kondensators Ladungen zu speichern und berechnet sich mit

$$C = \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot \frac{A}{d} [F].$$

Dabei entspricht ε_0 der elektrischen Feldkonstante des Vakuums in Farad pro Meter $[F/m]$, und ε_r der elektrischen Leitfähigkeit des Dielektrikums, also der Luft bzw. der Phospholipid-Membran (als einheitsloser Faktor). A gibt die Fläche der Membran $[m^2]$ und d deren Dicke $[m]$ an. Damit ergibt sich die Kapazität also aus der idealisierten

Geometrie des Kondensators mit der Einheit Farad. Der elektrische Leitwert berechnet sich nach dem Ohm'schen Gesetz aus dem Stromfluss I [A] über die Membran und der angelegten Spannung U [V] und trägt die Einheit Siemens.

$$G = \frac{1}{R} = \frac{I}{U} [S]$$

Nachdem der Kondensator effizient Ladungsträger voneinander trennt, ist der sich ergebende Stromfluss über eine intakte Membran, d.h. deren Leitwert gering. Spannungsänderungen wirken Kondensatoren aufgrund ihrer Ladungsspeicherefähigkeit entgegen, dadurch ergeben sich charakteristische Stromkurven bei Anlegen von Rechteck- bzw. Dreieck-Spannungen, die zur Charakterisierung intakter Membransysteme verwendet werden können [126, 127] (siehe Abb. 1.4).

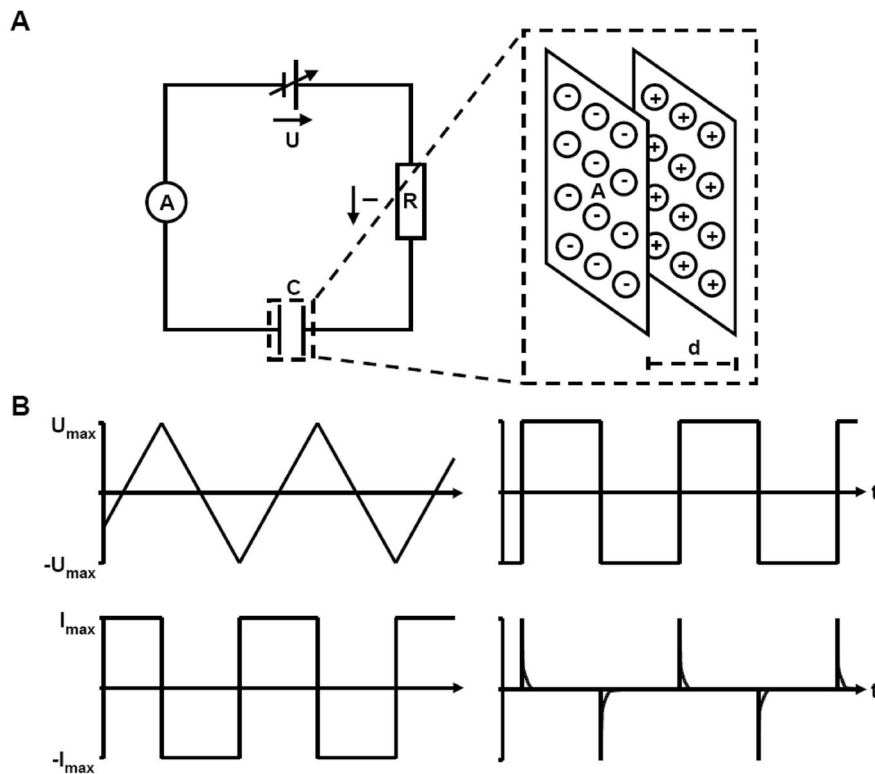


Abb. 1.4: Ersatzschaltbild und typische Spannungs-Stromkurven von Plattenkondensatoren. **A** Einfachste Kondensatorschaltung. Über eine regelbare Spannungsquelle wird die Spannung U angelegt. Über den elektrischen Widerstand der Schaltung fällt der Strom I ab. So ergibt sich die Ladungstrennung mit der Kapazität C , die im Wesentlichen von der Plattengröße A und dem Abstand der Platten d bestimmt wird. **B** Wird an einen Plattenkondensator eine Dreieck-Spannung angelegt, ist der resultierende Stromfluss auch bei veränderlicher Spannung konstant. Lediglich bei Umkehrung der Richtung der angelegten Spannung ändert sich das Vorzeichen des resultierenden Stromflusses. Wird eine Rechteck-Spannung angelegt, fließt kein Strom. Lediglich bei Änderung der Spannungsrichtung gibt es „On-Off“-Spitzen in der resultierenden Stromspur.

1.5.2 Generierung von Lipid-Doppelschichtmembranen: die *Painting*-Technik

Aufgrund ihrer amphipathischen, grenzflächenaktiven Eigenschaften weisen Lipide nur eine begrenzte Anzahl von Möglichkeiten auf, sich in wässrigen Lösungen an- bzw. zusammenzulagern. Diese Eigenschaften macht man sich bei der Generierung von Modellmembranen zu nutze. In wässriger Lösung bilden sich durch spontane Selbstassemblierung Lipid-Wasser-Grenzflächen. Dabei werden aufgrund der räumlichen Eigenschaften der Lipide, sprich der relativen Größe von hydrophiler Kopf- und hydrophober Schwanzgruppe unterschiedliche Anlagerungsformen aus Lipid-Einzel- oder Doppelschichten bevorzugt (siehe Abb. 1.5).

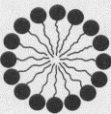

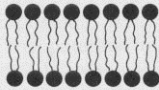

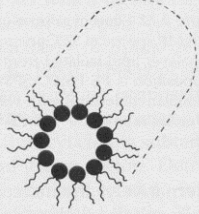

LIPID	PHASE	MOLECULAR SHAPE
LYSOPHOSPHOLIPIDS DETERGENTS	 MICELLAR	 INVERTED CONE
PHOSPHATIDYLCHOLINE SPHINGOMYELIN PHOSPHATIDYLSERINE PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHATIDYLGLYCEROL PHOSPHATIDIC ACID CARDIOLIPIN DIGALACTOSYLDIGLYCERIDE	 BILAYER	 CYLINDRICAL
PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE (UNSATURATED) CARDIOLIPIN - Ca^{2+} PHOSPHATIDIC ACID - Ca^{2+} ($\text{pH} < 6.0$) PHOSPHATIDIC ACID ($\text{pH} < 3.0$) PHOSPHATIDYLSERINE ($\text{pH} < 4.0$) MONOGALACTOSYLDIGLYCERIDE	 HEXAGONAL (H_{II})	 CONE

Abb. 1.5: Selbstassemblierung verschiedener Lipide in wässriger Lösung. In Abhängigkeit der molekularen räumlichen Struktur bilden unterschiedliche Lipide in wässriger Lösung bevorzugt unterschiedliche Lipid-Wasser-Grenzflächen aus. Durch Verwendung von Lipiden der richtigen Zusammensetzung kann so die Ausbildung bestimmter Strukturen forciert werden [128].

Bringt man nun in hydrophobem Lösungsmittel aufgenommene Lipide der richtigen Zusammensetzung (z.B. Phosphatidycholine, siehe Abb. 1.5) direkt auf eine hydrophobe Oberfläche wie Teflon auf, die bis auf eine Apertur im μm -Bereich wässrige Lösungen voneinander trennt, bildet sich eine mit einem Lösungsmittel-tropfen gefüllte Mizelle in der Apertur.

Unter Ausschluss des Lösungsmittels können dann die Einzelschichten beiderseits des Lösungsmittels zu einer Lipid-Doppelschicht fusionieren. Durch wiederholtes Auf- und Abpumpen des Puffers in den angrenzenden Kammern kann diese Fusion forciert werden. Die so entstehende Lipid-Doppelschichtmembran ist dann typischerweise von einem Annulus umgeben, bestehend aus Lipid-Einzelschichten und Lösungsmittel, das an der Trennschicht Lipide/Teflon-Septum verbleibt. Dieser Annulus stabilisiert die wenige nm dicke Lipid-Doppelschichtmembran am Übergang zum wesentlich dickeren Teflon-Septum (μm -Bereich) [129-131].

Durch die nur wenige nm betragende Stärke der Lipid-Doppelschichtmembranen, kommt es im Hellfeld zur destruktiven Interferenz zwischen an der proximalen und distalen Lipid-Einzelschicht reflektiertem Licht. Die Auslöschung des reflektierten Lichtes lässt die so generierten Lipid-Doppelschichtmembranen dunkel erscheinen, woraus sich die englische Bezeichnung „Black Lipid Membranes“ (BLMs) ableitet. Neben diesem optischen Hinweis kann die Formierung von BLMs auch über deren elektrophysikalische Eigenschaften (siehe 1.5.2) charakterisiert werden. Bei Schädigung der Membran werden die Ladungsträger nicht mehr effizient getrennt und der Stromfluss über die Membran erhöht sich. Dadurch wird auch die Schädigung anhand der Messung der physikalischen Kenngrößen detektierbar (siehe Abb. 1.6) [130, 132].

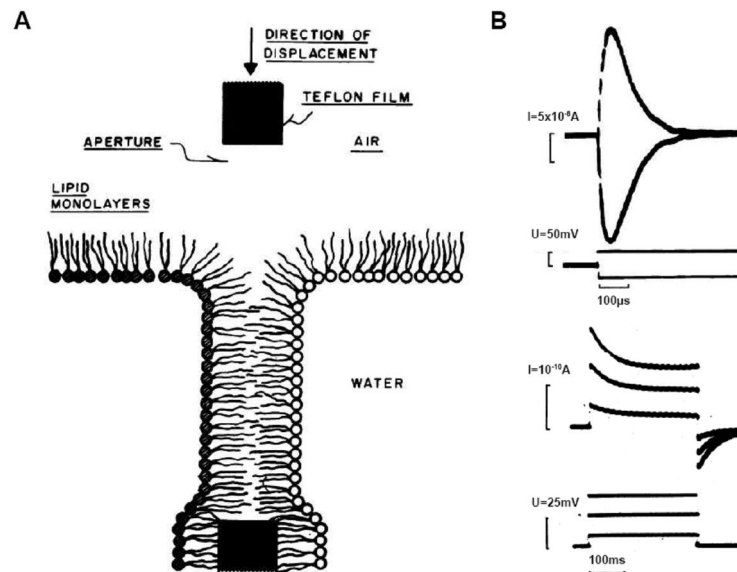


Abb. 1.6: Kondensatorphysik an Lipid-Doppelschichtmembranen. **A** Indem die Apertur in dem Teflon-Septum an der Lipid-Wassergrenzfläche vorbeigeführt wird, wird die Bildung von Lipid-Doppelschichtmembranen forciert. Diese stellen sich im Hellfeld dunkel, als sog. „Black Lipid Membranes“ (BLMs) dar [130]. **B** Legt man positive oder negative Rechteckspannungen an, gibt es entsprechend des Stromflusses über Plattenkondensatoren nur „On-Off“-Signale (oben; siehe auch 1.5.1). In Gegenwart porenbildender Toxine, wie Gramicidin erhöht sich der Stromfluss über die Membran deutlich (unten; siehe auch 1.5.3) [130].

1.5.3 Toxische Porenbildung in Lipid-Doppelschichtmembranen

Ein von der Evolution optimiertes System zur Vermittlung zelltoxischer Effekte durch Bildung oligomerer Poren in Lipid-Doppelschichtmembranen, stellen Bakterientoxine dar. Dazu gehören z.B. Gramicidine, die aus *Bacillus brevis* isoliert werden können. Dabei handelt es sich um Peptid-Antibiotika, die ihre bakterizide Wirkung durch Einlagerung in die Zellmembran vermitteln, indem jeweils zwei der lipophilen Monomere durch Dimerisierung einen helicalen Ionenkanal zwischen Zellinnerem und -äußerem bilden. Dieser ist spezifisch für monovalente Kationen wie Kalium-Ionen und erhöht den Stromfluss über künstlich erzeugte BLMs bei konstant angelegter Spannung (siehe Abb. 1.6 B) [130]. *In vivo* wird durch den einsetzenden unphysiologischen Ionenfluss entlang des Konzentrationsgradienten, das sekundäre Nachfließen von Wasser und damit einhergehenden osmotischen Druck der Zelltod sowohl bei pro- als auch eukaryotischen Zellen vermittelt [133, 134]. Ein weiteres Beispiel porenbildender Bakterientoxine ist α -Hemolysin. Dabei handelt es sich um ein Exotoxin von *Staphylococcus aureus*, das zyto- und neurotoxisch wirkt, indem es homoheptamere Poren in Lipid-Doppelschichtmembranen durch Oligomerisierung der wasserlöslichen Monomere an der Membranoberfläche bildet [135-137].

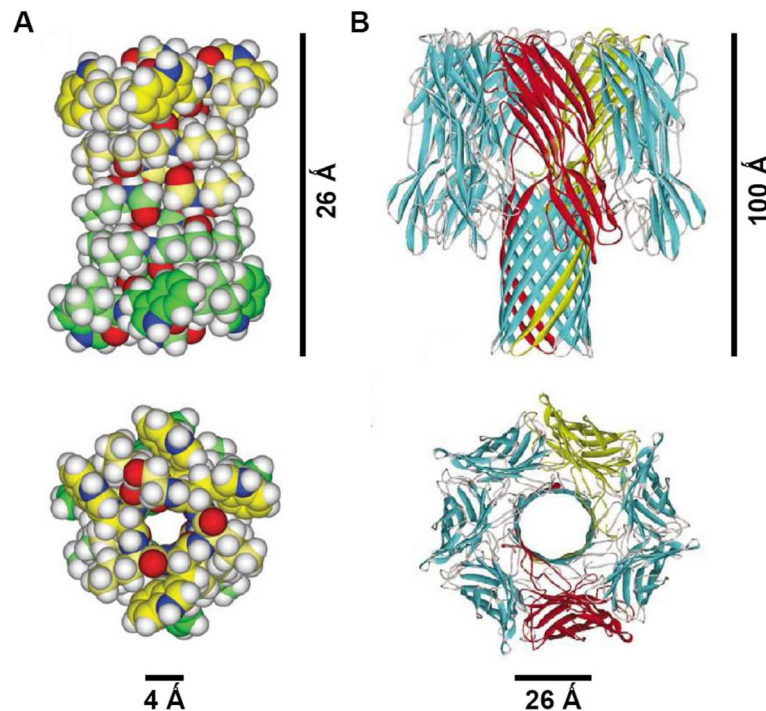


Abb. 1.7: Dreidimensionale Strukturen porenbildender Bakterientoxine. **A** Gramicidine aus *Bacillus brevis* bilden durch Einlagerung in Lipid-Doppelschichtmembranen dimere Ionenkanäle von 26 Å Länge und 4 Å Durchmesser [133, 134]. **B** α-Hemolysin von *Staphylococcus aureus* bildet homoheptamere Poren mit einer Länge von 100 Å und einem Durchmesser von 26 Å in Lipid-Doppelschichtmembranen [136, 137].

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob die durch eiseninduzierte α-Synuclein Oligomere vermittelte Nervenzellschädigung im Verlauf von Synucleinopathien auf eine pathologische Porenbildung zurückzuführen sein könnte.

Dazu sollte zunächst ein elektrophysiologisches System etabliert werden, in dem eine pathologische Bildung oligomerer Poren in künstlich erzeugten Lipid-Doppelschichtmembranen grundsätzlich auf Einzelkanalebene messbar wird. In diesem System sollte dann geprüft werden, ob α-Synuclein Oligomere die elektrophysiologischen Membraneigenschaften messbar beeinflussen können, und wenn ja, die entstandene Schädigung elektrophysiologisch charakterisiert werden, um die Frage zu klären, ob dadurch der Nervenzelltod verursacht werden könnte.

Dazu sollte in einem ersten Schritt das System hinsichtlich optimaler Randbedingungen für die Detektion und Charakterisierung von oligomeren Poren auf Einzelkanalebene optimiert werden.

Im nächsten Schritt sollten die Aggregationsbedingungen für die Generierung von α -Synuclein Oligomeren hinsichtlich einer maximalen Porendetektionsrate optimiert werden, um eine solide Datenlage für die Charakterisierung zu schaffen. Dazu dienten Daten aus früheren Studien auf Einzelmolekülebene als Ausgangspunkt.

Anschließend sollten die durch die Oligomere induzierten Membranschädigungen mittels standardisierter Messparameter hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften und damit hinsichtlich ihrer Spezifität und möglichen Wirkung auf biologische Membransysteme charakterisiert werden.

In einem weiteren Schritt sollte geprüft werden, inwieweit sich die Porenbildung zum einen durch rein *in vitro* wirksame Aggregationsinhibitoren hemmen lässt, und zum anderen durch neuartige Substanzen, die auch einen nennenswerten Effekt in *in vivo*-Modellen neurodegenerativer Erkrankungen haben.

Im letzten Schritt sollten die Aggregations- und Inhibitionsbedingungen und damit auch die porenbildenden Eigenschaften der eiseninduzierten α -Synuclein Oligomere hinsichtlich ihrer biologischen Relevanz als möglicher Pathomechanismus des Nervenzelltodes *in vivo* kritisch geprüft und der Ausgangspunkt für weiterführende Studien *in vivo* geschaffen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem α -Synuclein

2.1.1 Transformation von *Escherichia coli*

Kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) vom Stamm BL21(DE3)pLys (Novagen, Madison, USA) wurden mit ~300 ng eines pET-5a-Plasmids (Philipp Kahle, LMU München), das humanes α -Synuclein mit einer Punktmutation (136-TAC/TAT; Mathias Habeck, LMU München) für eine optimierte Nutzbarkeit in *E. coli* trug, transformiert. Dies geschah thermisch durch einen 1 min Hitzeschock von 42 °C nach 30 min Inkubation auf Eis. Nach Hinzufügen von 1 ml LB-Medium (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl auf 1 l dd H₂O; Roth, Karlsruhe) und Inkubation bei 37 °C und 200 rpm für 1 h, wurde die Bakteriensuspension bei 7000 rpm für 5 min zentrifugiert (Eppendorf 5415 R; Eppendorf, Wesseling-Berzdorf). 800 μ l des Überstandes wurden verworfen, und das Sediment im restlichen Medium resuspendiert. Anschließend wurden 190 bzw. 10 μ l der aufkonzentrierten Suspension auf LB-Agar-Platten (Roth) ausplattiert. Als Selektionsmarker wurde zum einen die durch das Plasmid vermittelte Ampicilin-, zum anderen die dem DE3-Bakterienstamm eigene Chloramphenicolresistenz verwendet (jeweils 0,1 bzw. 0,034 mg/ml LB-Agar). Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht (ü.N.) wurden einzelne Kolonien in LB-Medium mit Ampicilin und Chloramphenicol (Roth) in Konzentrationen von 0,1 bzw. 0,034 mg/ml bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte des Mediums von 0,6 bei einer Wellenlänge von 600 nm kultiviert (Biophotometer, Eppendorf). Zusätzlich wurde die Plasmid-DNA mittels eines Mini-Präparations-Kits nach Protokoll des Herstellers (GE-Healthcare, München) isoliert und sequenziert, um sicherzustellen, dass die verwendeten Bakterien auch das Transgen trugen (Elzbieta Staniszewski, LMU München).

2.1.2 Expression von α -Synuclein

Die Expression von α -Synuclein wurde durch Zugabe von Isopropyl β -D-Thiogalactopyranose (IPTG; Peqlab, Erlangen), einem künstlichen Induktor des Lactose-Operons in *E. coli*, induziert, und die exprimierenden Bakterien für weitere 4 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Danach wurden die Zellen mittels Zentrifugation (15 min bei 4 °C und 4000 g; Beckmann Avanti J25, Beckmann Coulter, Krefeld) aus dem Nährmedium sedimentiert und in insgesamt 300 ml Puffer (20 mM Tris, 25 mM NaCl, pH=8,0; Roth) resuspendiert.

Da α -Synuclein nativ ungefaltet ist, konnten die Zellen thermisch lysiert werden, weshalb auch auf die Verwendung von Protease-Inhibitoren verzichtet wurde. Nach kurzem Aufkochen bei maximaler Wattzahl in einer Mikrowelle zur Inaktivierung von Proteasen wurden die Zellen durch Kochen im Wasserbad bei 95 °C für 30 min lysiert. Zellreste wurden durch Zentrifugation (15 min bei 4 °C und 17000 g; Beckmann Avanti J25, Beckmann Coulter) sedimentiert, der entstandene Überstand abgenommen und über Filtropur S 0,2 μ m-Filter (Sarstedt, Nümbrecht) für die weitere Verwendung steril filtriert.

Die Aufreinigung und deren Dokumentation erfolgten unter Verwendung einer ÄKTA-Prime und der PrimeView 5.0-Software (GE Healthcare). Hierzu wurde das filtrierte Lysat nach den Vorgaben des Herstellers auf eine HiTrap Q HP-Anionentauschersäule mit 5 ml Volumen (GE Healthcare) aufgetragen, anschließend über einen linearen Salz-Gradienten (25-500 mM NaCl in 20 mM Tris, pH=8.0 über 100 ml) eluiert und in 2 ml-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen die einen deutlichen Anstieg in der Absorption bei Anregung durch eine Quecksilberdampflampe im UV-Bereich (Filter: 254 und 280 nm) aufwiesen, wurden mittels Coomassie-Gel und Western-Blot gegen einen geeigneten Größenmarker (PageRuler Prestained Protein Ladder; Fermentas, Sankt Leon-Rot) auf ihren α -Synuclein-Gehalt und ihre Reinheit geprüft [138-140]. Für beides wurden SDS-PAGE-Gele mit 15 % Acrylamid für die Gelelektrophorese verwendet. Anschließend wurde das Gel entweder mit Coomassie-Blau behandelt (20 min bei Raumtemperatur (RT) und 100 rpm) und mit Entfärber-Lösung wieder entfärbt, oder auf eine PVDF-Membran transferiert (Millipore, Eschborn). Diese wurde dann mit 15G7, einem monoklonalen Antikörper aus der Ratte gegen humanes α -Synuclein, behandelt (1:1000 in TBS-Tween; bei 4 °C und 100 rpm ü.N.). Als Sekundär-antikörper wurde

alkalische Phosphatase-gekoppelter Goat-anti rat (Dako, Glostrup, Dänemark; 1:1000 in TBS-Tween; 1 h bei RT und 100 rpm) verwendet, der mittels CDP-Star (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) chemilumineszent in einem ChemiLux-Kamerasystem unter Verwendung der ChemoStar-Software (Intas, Göttingen) sichtbar gemacht und dokumentiert wurde.

Für die weitere Aufreinigung wurden nur die Fraktionen verwendet, die eine starke Bande auf Höhe 14-17 kDa und nur wenig degradiertes α -Synuclein, sowie schwerere Protein-Banden aufwiesen. Um aus den verwendeten Fraktionen monomeres von aggregiertem Protein nach Größe abzutrennen wurde eine Gel-Filtration über eine Superdex 75-Säule (GE Healthcare) nach Vorgaben des Herstellers vorgenommen. Dazu wurden die Fraktionen zunächst für 45 min bei 4 °C und 40.000 g ultrazentrifugiert (Beckmann Coulter Optima TX, Beckmann Coulter), um höherbandige Proteine abzutrennen und durch Verwendung von Vivaspin-Säulen mit einem Volumen von 2 ml und einem *Cut-off* bei einem Molekulargewicht von 3000 kDa (Sartorius, Göttingen) nach Vorgabe des Herstellers von niederbandigen Proteinen und degradiertem α -Synuclein befreit und auf ein Gesamtvolumen von 200-500 μ l eingeeengt. Diese hochkonzentrierte Proteinlösung wurde dann mittels einer Insulinspritze wieder in das ÄKTA-prime-System eingebracht und mittels Laufpuffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH=7,0) über die Gelfiltrationssäule nach Größe aufgetrennt. Das Eluat wurde in 1 ml-Fraktionen gesammelt, und die Fraktionen mit der deutlichsten Absorption im UV-Bereich wieder mittels Coomassie-Gel und Western-Blot auf Reinheit und Protein-Gehalt überprüft (s.o.).

2.1.3 Qualitätskontrolle

Die Fraktionen mit einer deutlichen α -Synuclein-Bande wurden zusammengeführt und die Protein-Konzentration in einem BCA-Assay [141] bestimmt, unter Verwendung von Bicinchoninsäure und Kupfer(II)-Sulfat (Thermo Fisher Scientific, Bonn) in einem Verhältnis von 50:1 relativ zu einer Verdünnungsreihe von Bovinem Serum Albumin (BSA; Sigma-Aldrich). Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C wurde die Färbung, und damit der Proteingehalt mittels Messung der Absorption bei 560 nm im FLUOstar Optima-System unter Verwendung der mitgelieferten Software (BMG Labtech, Offenburg) bestimmt und dokumentiert.

Durch Verdünnung in 50 mM Tris-HCl, pH=7,0 (Roth) wurde die Proteinlösung auf die Arbeitskonzentration von 1 mg/ml eingestellt. Mittels Massenspektrometrie mit Flugzeitanalyse nach Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation (engl.: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS; Lars Israel, LMU, München) wurde abschließend die Qualität der Protein-Charge geprüft [142]. Anschließend wurde die Proteinlösung aliquotiert, über flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2 Fluoreszenz-Markierung

Um die Aggregation von α -Synuclein mittels konfokaler Einzelmolekülspektroskopie zu untersuchen, wurde rekombinantes α -Synuclein mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa Fluor-488-O-Succinimidylester bzw. Alexa Fluor-647-O-Succinimidylester (Invitrogen, Darmstadt) markiert. Dabei bilden sich stabile Farbstoff-Protein-Konjugate durch kovalente Bindung der Succinimidylester an primäre Aminogruppen des Proteins. Um jedes α -Synuclein Monomer im Durchschnitt ein- bis zweifach zu markieren, wurde der jeweilige Fluoreszenzfarbstoff im stöchiometrischen Verhältnis von 2:1 im Vergleich zur molaren Konzentration des α -Synucleins eingesetzt. Um ein geeignetes Reaktionsmilieu zwischen pH=7,5 und 8,5 für die Bindung der Succinimidylester zu schaffen, beinhaltete der Ansatz 10 % (v/v) 1 M NaHCO_3 (Roth), pH=8,5. Nach Inkubation bei 4 °C ü.N. wurden die ungebundenen Farbstoffmoleküle des Reaktionsansatzes chromatographisch abgetrennt. Dies erfolgte in zwei Filtrationsschritten mittels PD-10 Säulen, die mit 50 mM Tris-HCl, pH=7,0 nach Angaben des Herstellers äquilibriert wurden (GE-Healthcare). Nach Auftragen von insgesamt 2,5 ml des Markierungsansatzes auf die erste Säule, wurde mit 3,5 ml 50 mM Tris-HCl, pH=7,0 eluiert, und fünf Fraktionen in den Größen 0,5/1/1/0,5/0,5 ml gesammelt. Die Fraktionen 2-4 wurden einzeln nacheinander auf die zweite Säule aufgetragen, wiederum mit 3,5 ml Puffer eluiert und in insgesamt sieben 0,5 ml-Fraktionen gesammelt.

Mittels FCS wurde das markierte α -Synuclein hinsichtlich Markierungsrate, Diffusionszeit und Partikelzahl charakterisiert, sowie die Partikelzahl des freien Farbstoffes in einem Zwei-Komponenten-Fit (siehe 2.3.2) bestimmt. Typischerweise enthielten die Fraktionen 3-5 das Konzentrationsmaximum an markiertem α -

Synuclein. Diese wurden gepoolt und bei 4 °C und 100.000 g für 45 min ultrazentrifugiert (Beckmann Coulter Optima TX), um die Stammlösung von potentiell präformierten Aggregaten zu befreien (Beckmann Coulter Optima TX). Für die Bestimmung der mittleren Anzahl an Farbstoffmolekülen pro α -Synuclein Monomer (Markierungsrate) wurde im Anschluss an die Markierungsreaktion aus jedem Ansatz eine Probe entnommen und diese mit 50 mM Tris-HCl, 0,1% NP-40 (Roche, Penzberg), pH=7,0 auf eine Konzentration von 2-5 nM α -Synuclein eingestellt. Jeder Ansatz wurde mit und ohne 0,1 mg/ml Proteinase K (Merck) bei 37 °C unter ständigem Schütteln für 1 h inkubiert. Danach wurden die unverdaute Kontrolle und der verdaute Ansatz im Insight Reader analysiert (siehe 2.3). Das Verhältnis der Partikelzahl der verdauten Lösung zur Partikelzahl der unverdauten Lösung lieferte so die Anzahl der durchschnittlich pro α -Synuclein Monomer gebundenen Farbstoffmoleküle. Anschließend wurde das markierte Protein aliquotiert, über flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.3 Konfokale Einzelmolekülspektroskopie

Um auf Einzelmolekülebene das Aggregationsverhalten des α -Synucleins unter verschiedenen Rahmenbedingungen zu charakterisieren, wurde die konfokale Einzelmolekülspektroskopie eingesetzt, im Besonderen die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (engl.: fluorescence correlation spectroscopy, FCS) mit der Autokorrelations- und Kreuzkorrelationsanalyse, die Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungsanalyse (engl.: fluorescence intensity distribution analysis, FIDA) und das Scannen nach intensiv fluoreszierenden Zielstrukturen (engl.: scanning for intensely fluorescent targets, SIFT) [143-149].

2.3.1 Messaufbau und -bedingungen

Die Messungen wurden mit einem Insight Reader durchgeführt (Evotec-Technologies, Hamburg), der im Wesentlichen ein konfokales Mikroskop darstellt. Durch den Messaufbau wird Laserlicht von einem Argon-Ionen-Laser und einem Helium-Neon-Laser mit den Wellenlängen 488 nm bzw. 633 nm durch ein 40x Wasserimmersionsobjektiv (Olympus, Hamburg) mit hoher numerischer Apertur (1,2) in das Probenvolumen fokussiert. Das Fokusvolumen beträgt dabei etwa 1 fl, was in etwa

der Größe eines *E. coli*s entspricht. Als Probenträger wurden 384-Well-Platten (Evotec-Technologies/Perkin Elmer, Hamburg), mit Glasboden und einem Reaktionsvolumen von 20 μl /Well verwendet. Der Laserfokus wurde 150 μm über dem Glasboden des Probenträgers in die Messlösung eingestellt. Optisch wurden die Position und die Abbildung des Laserfokus mit einer über Spiegel mechanisch zuschaltbaren Videokamera kontrolliert. Die nach Anregung der fluoreszierenden Partikel im Lasermessfokus emittierten Photonen werden retrograd dem Weg des Anregungslichts entgegen durch die Objektivlinse über zwei dichroische Spiegel und eine Lochblende (engl.: pinhole) mit einem Durchmesser von 70 μm getrennt auf zwei Einzelphotonendetektoren (Avalanche-Photodioden) abgebildet (siehe Abb. 2.1). Dadurch ist es möglich, das Fluoreszenzsignal in zwei Kanälen separat, aber parallel aufzuzeichnen und auszuwerten. Die Ansteuerung der Servomotoren für den Probenträgertisch und die Positionen der Laserfoci und der Lochblende am Insight Reader wurden über die mitgelieferte Software FCS+Plus_Control gesteuert.

Um eine konstante und gleichmäßige Laserleistung während der Experimente zu gewährleisten, wurden die Laser 30 min vor Beginn der ersten Messung in Betrieb genommen. Anschließend wurde die Laserleistung sowohl für den Argon-Ionen-Laser bei 488 nm, als auch für den Helium-Neon-Laser bei 633 nm separat gemessen und auf die Anregungsleistungen von 200 μW bzw. 300 μW eingestellt. Danach erfolgten die Justagen der Lochblende und der Glasfaserleitungen, sowie die manuelle Einstellung des optischen Korrekturrings am Objektiv. Als Referenzwert für die Justage wurde eine Messlösung aus freiem Farbstoff (Alexa 488 und Alexa 647) mit bekannten Parametern verwendet. Die entscheidenden Parameter, die zum Vergleich der Justageeinstellungen und zur Einstellung einer optimalen Fokusabbildung herangezogen wurden, waren die CPP (engl.: counts per particle), die ein Maß für die Helligkeit der einzelnen Farbstoffmoleküle unabhängig von der Farbstoffkonzentration darstellt, sowie die Diffusionszeit (T_{diff}) der Farbstoffmoleküle, mit der sich die Abbildungsschärfe des Lasermessfokus bestimmen lässt.

Die Messzeit betrug 10-15 s pro Einzelmessung. Während der gescannten Messungen wurden die Proben auf einer Länge von 100 μm gescannt, die Frequenz des mobilen Fokus (Beams Scanner) auf 50 Hz und die Distanz der Probentischverschiebung auf 2000 μm festgesetzt. Alle Messungen wurden bei RT durchgeführt.

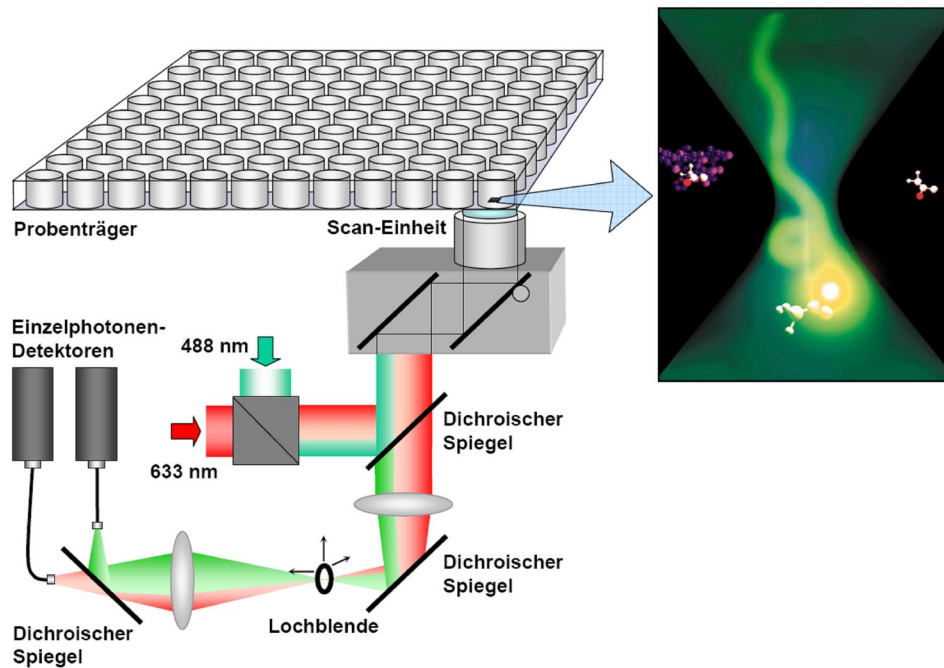


Abb. 2.1: Messaufbau des Insight Readers. Schematische Darstellung des zwei-Farben-FCS-Readers mit Beams Scanner-Einheit. Das Laserlicht wird über einen dichroischen Spiegel und die konfokale Optik des Mikroskops in das Probenvolumen fokussiert. Emittierte Photonen werden retrograd dem Weg des Anregungslichts entgegen über zwei dichroische Spiegel und eine Lochblende getrennt auf zwei Einzelphotonendetektoren abgebildet (modifiziert nach [46]).

2.3.2 Analyseverfahren

2.3.2.1 Korrelationsanalysen

Bei der Autokorrelationsanalyse, die nur bei Messungen mit einem stationären Fokus sinnvoll anzuwenden ist, wird die Fluktuation im Fluoreszenzsignal über die Zeit charakterisiert. Bei der verwendeten FCSP Evaluation 2.0 Software (Evotec Technologies) wird dabei die Messzeit der Einzelmessung in Zeitscheiben von minimal 50 ns unterteilt. Je nachdem, ob in diesen Zeiteinheiten Photonen detektiert worden sind oder nicht, wird der Zeitscheibe der Zahlenwert 1 (mindestens ein Photon detektiert) oder 0 (kein Photon detektiert) zugeordnet. Daraus resultiert eine Zahlenreihe von aufeinanderfolgenden Einsen und Nullen, welche die Messung beschreibt. Anschließend wird für die Autokorrelationsanalyse der Wert jeder Zeit mit dem Wert einer weiteren Zeit multipliziert, die in Vielfachen (Korrelationszeiten) des kleinsten Abstandes von 50 ns entfernt liegt. Die Multiplikation der Zeitfenster wird über den gesamten Datensatz mit verschiedenen Korrelationszeiten durchgeführt und das Ergebnis konsekutiv für jede Korrelationszeit addiert. Zudem werden die Werte der pro Korrelationszeit detektierten Photonen auf die mittlere Häufigkeit

normiert. An das entstehende Autokorrelogramm wird eine mathematische „Fit“-Kurve in einem iterativen Prozess angepasst (engl.: fitting). So können aus dem Autokorrelogramm verschiedene Parameter wie die durchschnittliche Diffusionszeit der Partikel (T_{diff}), die mittlere Helligkeit (CPP) und die mittlere Partikelzahl im Lasermessfokus (N) berechnet werden. Um die Qualität des Fits zu überprüfen, wurde der Parameter χ^2 herangezogen.

Die Gesamthelligkeit (I_{tot}) entspricht dabei der mittleren Photonenzahl (angegeben in kHz) über die gesamte Messzeit und geht als gemessene Größe direkt aus der Messung hervor. Die mittlere Helligkeit der einzelnen Partikel im Messfokus (CPP) berechnet sich aus der Intensität des gemessenen Fluoreszenzsignals pro Anzahl der Partikel. Mit Hilfe der Diffusionszeit (T_{diff}) ist es möglich, die ungefähre Masse der gemessenen Partikel zu berechnen. Im Rahmen von Proteinaggregationsstudien kann somit die Anzahl der Monomere, aus denen sich ein Proteinaggregat zusammensetzt, näherungsweise bestimmt werden. Während einerseits im Verlauf von Aggregationsprozessen die T_{diff} und die CPP der Partikel zunehmen, sinkt andererseits deren N.

Mit der FCSP Evaluation Software können auch verschiedene Molekülspezies erkannt werden. In einem sog. Mehrkomponenten-Fit wird jeder Komponente der relative Anteil an der Gesamtmenge der Partikel (in %) und eine entsprechende eigene T_{diff} zugeordnet.

Die Kreuzkorrelationsanalyse stellt eine Form der Korrelationsanalyse für Messungen mit Fluoreszenzsignalen in mehr als einem Kanal dar. Dabei können sensitiv intermolekulare Aggregationsprozesse quantitativ analysiert werden, indem die detektierte Signalintensität innerhalb eines Kanals für die verschiedenen Korrelationszeiten mit der Signalintensität im zweiten Kanal korreliert wird. Durch die Detektion von Partikelspezies, die ein koinzidentes Signal in beiden Kanälen aufweisen, können diese leicht vom „Hintergrund“, also Partikeln mit Signalen in nur einem Kanal abgetrennt werden. Unter der Annahme, dass während der Messung die Gesamthelligkeit unverändert bleibt, lassen sich Parameter wie die Konzentration, die Diffusionszeit und die spezifische Helligkeit der zweifarbig markierten Partikelspezies bestimmen.

Typischerweise werden hier unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Bindungspartner verwendet, um z.B. die Bindung von Rezeptoren an Liganden zu untersuchen [143, 144, 149].

2.3.2.2 FIDA

Die FIDA-Analyse wird verwendet, um verschiedene Molekülspezies hinsichtlich ihrer spezifischen Helligkeit zu unterscheiden. Dabei wird mit Hilfe der Evaluation 2.0 Software (Evotec Technologies) die Helligkeitsverteilung in konsekutiven Zeitintervallen konstanter Länge (engl.: bins), typischerweise 40 μ s statistisch ausgewertet. Die Anzahl detektierter Photonen pro bin und die Häufigkeit dieser Ereignisse werden dann in einem Intensitätsverteilungshistogramm dargestellt. Diese Daten können dann durch einen FIDA-Multikomponenten-Fit statistisch analysiert werden.

Dadurch ist es möglich, die vorhandenen, unterschiedlich fluoreszierenden Molekülspezies auf der Basis ihrer spezifischen molekularen Helligkeit im jeweiligen Kanal zu charakterisieren. Analog zur Autokorrelationsanalyse wird bei der FIDA-Analyse jede Molekülspezies mit charakteristischer Fluoreszenz mit einer für sie spezifischen Helligkeit (Q , in kHz) und einer durchschnittlichen Konzentration (C) beschrieben. Nachdem diese Analyse unabhängig von der Diffusionszeit ist, kann sie sowohl für ungescannte als auch für gescannte Messungen verwendet werden. Für die Analyse zweifarbig markierter Molekülspezies wird die 2D-FIDA-Analyse verwendet. Dabei werden die detektierten Photonen, die in den bins durch beide Detektoren simultan aufgezeichnet werden gleichzeitig statistisch ausgewertet. Durch den 2D-FIDA-Multikomponenten-Fit können verschiedene ein- oder zweifarbig fluoreszierende Partikel anhand ihrer spezifischen Helligkeit in beiden Detektionskanälen analysiert werden. Die Gesamthelligkeit I_{tot} wird in die Anteile der verschiedenen fluoreszierenden Molekülspezies aufgeteilt, die dann wiederum jeweils anhand ihrer spezifischen Helligkeit in den beiden Detektionskanälen (grün, rot) aufgelöst werden. Neben der spezifischen Helligkeit ein- oder zweifarbig fluoreszierender Molekülspezies kann auch deren Konzentration analysiert werden. Die Frequenz der koinzident detektierten Photonen wird in einem zweidimensionalen Intensitätsverteilungshistogramm erfasst. Auch hier kann durch den Beams Scanner die Sensitivität für seltene, langsam diffundierende Partikel durch ein größeres Detektionsvolumen deutlich erhöht werden [145, 147].

2.3.2.3 SIFT

Mit der hochsensitiven SIFT-Analyse über die 2D-SIFT Software (Evotec Technologies) können zweidimensionale Intensitätsverteilungshistogramme ebenfalls ausgewertet werden [146]. Analog zur 2D-FIDA wird das Fluoreszenzsignal in bins unterteilt und aufgezeichnet. Dadurch können mehrfach markierte, große Partikel in der Intensitätsverteilung durch Setzen eines Schwellenwertes vom Hintergrundrauschen abgetrennt werden. Durch Verwendung des Beamscanners werden dabei auch seltene, große und deshalb langsam diffundierende Partikel erfasst. Dadurch ist es jedoch nicht mehr möglich, die Diffusionszeit zu analysieren, da die durchschnittliche Aufenthaltsdauer der Partikel im Messfokus nicht mehr durch die Beschaffenheit des Teilchens, sondern von der Scangeschwindigkeit bestimmt wird. Aber das Signal gleich intens leuchtender Partikel wird in etwa auf die gleiche Anzahl von bins abgebildet wird. Die Anzahl dieser „hochintensen bins“, korreliert somit mit der Anzahl und der Konzentration hochintens fluoreszierender Zielmoleküle (engl.: intensely fluorescent targets). Die gewonnen Daten der SIFT-Messungen werden analog zur 2D-FIDA in einem zweidimensionalen Fluoreszenz-intensitätsverteilungshistogramm dargestellt (siehe Abb. 2.2). Die bins mit hochintensem Fluoreszenzsignal oberhalb des Schwellenwertes werden dabei aufsummiert. Zusätzlich zur Anzahl der hochintensen bins kann auch die Anzahl der in diesen erfassten Photonen analysiert werden. Nicht aggregierte Kontrollproben wurden als Referenz verwendet, um den Schwellenwert für die Erfassung hochintenser bins festzusetzen [46, 146, 148, 150].

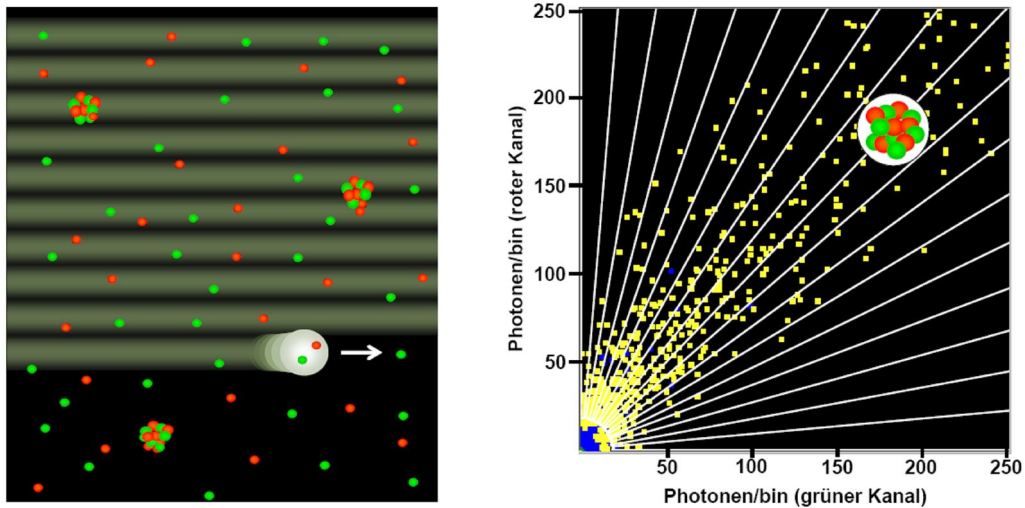


Abb. 2.2: 2D-FIDA- und SIFT-Methode. Schematische Darstellung der SIFT-Messung, bei der der Lasermessfokus durch das Probenvolumen verfahren wird. Durch das so vergrößerte erfasste Volumen im Vergleich zu einem stationären Lasermessfokus, wird die Messung sensitiver für seltene, große hochintense Partikel. Im zweidimensionalen Intensitätsverteilungshistogramm wird die Anzahl der bins mit gleichen Werten für die erfassten grünen und roten Photonen in ihrer Häufigkeit farbkodiert dargestellt.

2.3.3 Aggregationsansatz für die Einzelmolekülspektroskopie

Zunächst wurden die mit Alexa 488- und mit Alexa 647-markierten α -Synuclein Fraktionen in 50 mM Tris-HCl, pH=7,0 verdünnt und mit Hilfe von FCS- und SIFT-Messungen einer Qualitätskontrolle hinsichtlich der Diffusionszeit, der Konzentration, der Partikelhelligkeit und die Anwesenheit präformierter Aggregate in der Stammlösung untersucht. Im Anschluss an die Qualitätskontrolle wurde eine fünffach α -Synuclein Stammlösung, bestehend aus einer Mischung von Alexa 488- und Alexa 647-markierten α -Synuclein Monomeren in 50 mM Tris-HCl, pH=7,0 angesetzt. Die Endkonzentrationen der fluoreszenzmarkierten α -Synuclein Monomere wurden jeweils auf 5-10 Moleküle pro Fokusvolumen eingestellt, was etwa einer Konzentration von 10-20 nM entspricht. Die Aggregationsexperimente wurden mit der Zugabe der α -Synuclein Stammlösung in die entsprechenden Aggregationsansätze gestartet. Die Aggregationsansätze mit einem Endvolumen von 20 μ l setzten sich aus 50 mM Tris-HCl, pH=7,0 in Gegenwart von 1 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich) und 10 μ M Eisen(III)-Chlorid-Hexahydrat (Merck, Darmstadt) zusammen [59, 86, 90].

2.3.4 Pharmakologische Inhibition der Oligomerbildung

Um den Konzentrationsbereich festzulegen, in dem die Oligomerbildung *in vitro* effektiv inhibiert wird, wurde der unter 2.3.3 beschriebene Aggregationsansatz zusätzlich nach Co-Inkubation mit Aggregationsinhibitoren verwendet. Dazu wurden anle138b und anle138c verwendet, neuartige Substanzen aus der Klasse der 3,5-Diphenyl-Pyrazole, die bei einem großangelegten Screen zur Aggregationsinhibition pathologischer Proteine *in vitro* entdeckt wurden [151, 152]. Als Referenzsubstanz wurde Baicalein (5,6,7-Trihydroxyflavon) verwendet, ein gut untersuchter Inhibitor der Proteinaggregation *in vitro* aus der Gruppe der Flavonoide, der ursprünglich aus den Wurzeln von *Scutellaria baicalensis* aufgereinigt wurde [59, 86, 118, 153] (siehe Abb. 2.3).

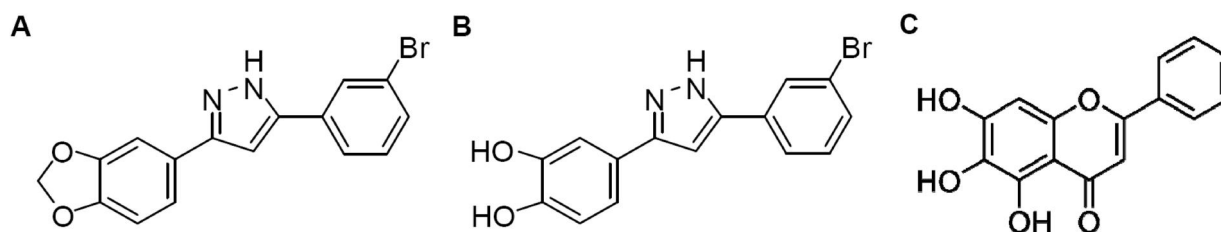


Abb. 2.3: Strukturformeln der Aggregationsinhibitoren anle138b, anle138c und Baicalein. A, B anle138b und anle138c aus der Klasse der 3,5-Diphenyl-Pyrazole zeigen eine starke Tendenz zur Inhibition pathologischer Proteinaggregate *in vitro* [151, 152]. C Baicalein aus der Klasse der Flavanoide ist ein starker Inhibitor der Proteinaggregation *in vitro* [153].

2.4 Einzelkanal-Elektrophysiologie

2.4.1 Herstellung und Charakterisierung von BLMs

Für die Einzelkanal-Elektrophysiologie wurde als Messgerät der Ionovation Compact verwendet (Ionovation, Osnabrück). Die unter 1.5 genannten Grundsätze der Membranphysiologie sind dabei folgendermaßen realisiert:

Polypropylen-Messkammern mit einem Gesamtvolumen von 3 ml sind durch ein Teflon-Septum in zwei Reaktionsräume (im Weiteren als *cis*- und *trans*-Kammer bezeichnet) getrennt. In dem Septum befindet sich eine Apertur, in der die Lipid-Doppelschichtmembran generiert wird. Dazu werden beide Kammerseiten mit jeweils 1,2 ml Kammerpuffer beschickt und 2 µl einer Lösung aus aufgereinigtem Azolectin in n-Decan (100 mg/ml, Ionovation) direkt auf die Apertur auf seiten der *trans*-

Kammer appliziert. Azolectin stellt eine Mischung von Phospholipiden dar, die aus der Sojabohne gewonnen wird und planare ungeladene Membranoberflächen bildet. Da für die eiseninduzierten Oligomere beschrieben wurde, dass sie unabhängig von Ladung und Oberflächenkrümmung an Lipid-Membranen binden, wurde dieses gut charakterisierte Modelllipid verwendet [59, 86, 154].

Über Servomotoren wird ein puffergefülltes Spritzensystem angesteuert, über das ein Ansaugstutzen in die Lösung der *trans*-Kammer verfahren und der Kammerpuffer luftblasenfrei abgesenkt und wieder aufgefüllt werden kann. Dabei wird der Puffer mit einer Geschwindigkeit von 7,2 ml/min soweit abgesenkt, dass der Spiegel unter das Niveau der mit Lipid-Lösung bedeckten Apertur sinkt (~0,8 ml). So werden die applizierten 2 µl zunächst auf einen von Lipid-Einzelschichten eingeschlossenen n-Decan-Tropfen reduziert und schließlich die Fusion der Einzel- zur Doppelschichtmembran forciert (siehe Abb. 2.4, vgl. 1.5.2).

Silber-Silberchloridelektroden sind jeweils mit einer 2 M KCl/1 % Agarose-Salzbrücke luftblasenfrei mit dem Kammerpuffer und über BNC-Stecker mit dem Gerät verbunden. Somit können Spannungen angelegt, und der resultierende Stromfluss über die Membran gemessen werden. Dabei ist die Elektrode in der *trans*-Kammer direkt mit einem EPC 10-Verstärker (HEKA, Lambrecht/Pfalz) verbunden, wodurch sich alle angelegten Spannungen auf diese Kammerseite beziehen. Das Rauschen lag dabei bei 0,4 pA (r.m.s.) bei einer Bandbreite von 3 kHz, das Signal wurde durch 2,5 bzw. 10 kHz Bessel-Filter prozessiert.

Die Bildung der Lipid-Doppelschichtmembranen wurde optisch und durch wiederholte Messungen von Kapazität und Leitwert bei Anlegen von 10 mV-Testpulsen überprüft. Dabei lag die Kapazität typischerweise im Bereich von 60-80 pF und der Leitwert einer intakten Membran bei 8-10 pS, was einem elektrischen Widerstand von >100 GΩ entspricht (siehe 3.3.1). Zusätzlich zu den für Kondensatoren typischen Spannungs-Stromkurven (siehe 1.5.1) wurde α-Hemolysin (Sigma Aldrich) als Positivkontrolle für die Membran- und die Porenbildung verwendet, da es spezifisch Poren in BLMs bildet (siehe 1.5.3). Dazu wurden 5 µl (~10 aktive Einheiten auf 1,2 ml Kammerpuffer) nahe der BLM in den Puffer der *cis*-Kammer appliziert und die Lösung in beiden Kammern über Magnetrührer mit 300 rpm gerührt, während ±20 mV Rechteckspannungsreize (jeweils 10 s) angelegt wurden. Durch einen anschließenden 10 mV-Testpuls bei ungerührter Lösung wurden die Kapazität und der Leitwert bestimmt. Stieg der Leitwert über den ermittelten Schwellenwert einer

Membranschädigung von 70 pS (siehe 3.3.1) wurde eine Schädigung der BLM angenommen und automatisch ein standardisiertes Messprotokoll gestartet, durch das die Schädigung hinsichtlich des Verhaltens bei verschiedenen angelegten Spannungen charakterisiert wurde.

Dabei wurde zunächst eine Spannungsrampe von -120 bis +120 mV über 10 s angelegt und dann für jeweils 10 s folgende Rechteckspannungen, um die Schädigung zunächst im mittleren und dann in den extremen Spannungsbereichen zu charakterisieren:

-60/-50/-40/-30/-20/-10/0/+10/+20/+30/+40/+50/+60 mV
-60/-70/-80/-90/-100/-110/-120 mV
+60/+70/+80/+90/+100/+110/+120 mV

Zur Bedienung des Gerätes und zur Dokumentation der Messungen wurde die Patchmaster-Software v2x53 (HEKA) verwendet. Die Auswertung der Messungen geschah über ein Matlab-basiertes Analyse-Programm (Mathworks, Aachen; Kai Bötzel, LMU, München), mit dessen Hilfe der Leitwert der Membran während den Messungen mit hoher zeitlicher Auflösung analysiert werden konnte.

Zunächst wurde das System in Pilotversuchen für Aperturgrößen von 70, 100, 150 und 200 μm etabliert. Ziel war es dabei zum einen die Schwellenwerte für Kapazität und Leitwert zu ermitteln, ab derer man von intakten bzw. nicht mehr intakten BLMs ausgehen kann. Zum anderen sollte die Aperturgröße identifiziert werden, die einen optimalen Kompromiss zwischen möglichst großer BLM-Fläche und möglichst großer Membranstabilität darstellt. So sollte gewährleistet sein, dass die Wahrscheinlichkeit einer Insertion der Oligomere in die BLM durch eine große Fläche maximiert wird, die BLM aber auch über die ganze Dauer des Versuches und bei Insertion von Poren stabil bleibt.

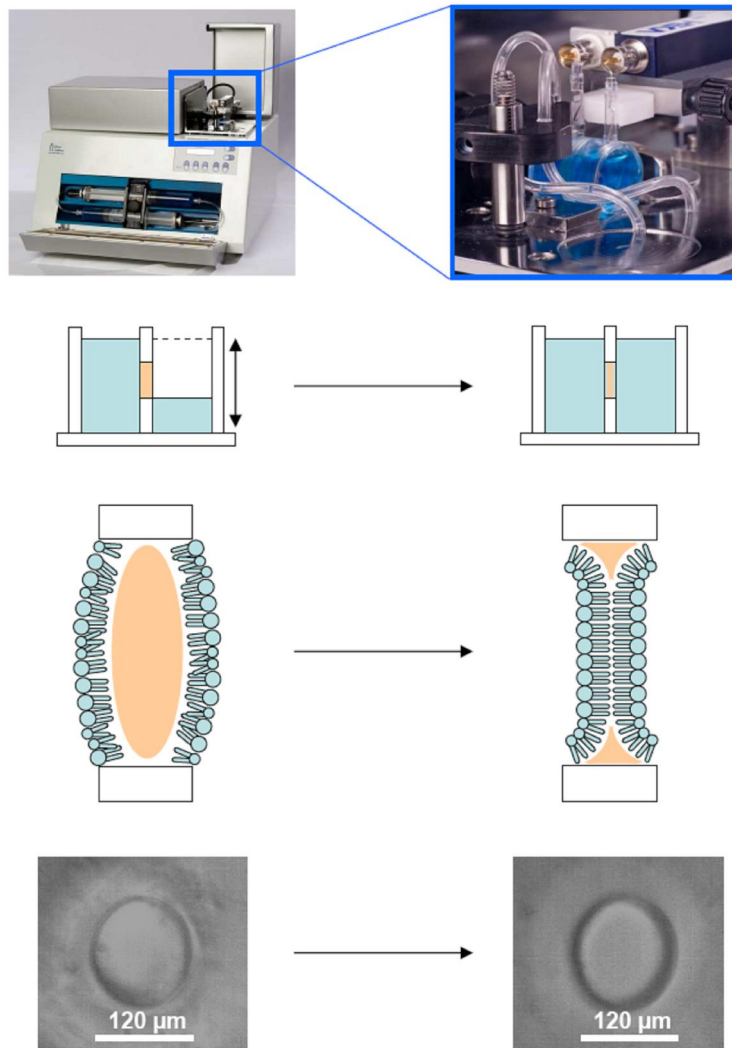


Abb. 2.4: Erzeugung von Lipid-Doppelschichtmembranen im Ionovation Compact. Auf die Apertur im Teflon-Septum der puffergefüllten Messkammer wird direkt die Lipid-Lösung aufgebracht. Durch wiederholtes Auf- und Abpumpen des Puffers wird die Fusion der beidseitig des hydrophoben Lösungsmittels vorhandenen Einzelschichten forciert. Die Formierung der Doppelschichtmembran lässt sich optisch anhand der Bildung des im Hellfeld dunklen Lösungsmittel-Torus, der die Lipid-Membran am Teflon-Septum stabilisiert verfolgen.

2.4.2 Aggregationsansatz für die Einzelkanal-Elektrophysiologie

Um die Aggregation von α -Synuclein und damit die Entstehung der auf ihre mögliche Interaktion mit BLMs zu untersuchenden eiseninduzierten Oligomere zu forcieren, wurde das aufgereinigte rekombinante α -Synuclein (siehe 2.1) in Konzentrationen von 7,0, 2,1 und 0,7 μM jeweils mit 1 % (v/v) DMSO und 20 μM FeCl_3 in einem Gesamtvolumen von 200 μl bei RT in Protein-LoBind-Reaktionsgefäßen mit einem Fassungsvermögen von 0,5 ml (Eppendorf) inkubiert [59, 86, 118]. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0, 4, 24, 48, 72 und 96 h) wurden die

Aggregationsansätze hinsichtlich ihres Vermögens untersucht, messbar die elektrophysiologischen Eigenschaften von Lipid-Membranen zu beeinflussen. Somit wurde das Aggregationsprotokoll hinsichtlich Proteinkonzentration und Inkubationszeit in Richtung einer maximalen Poren-Detektionswahrscheinlichkeit optimiert.

2.4.3 Charakterisierung des Effektes von α -Synuclein Oligomeren auf BLMs

Nach Bildung der Lipid-Doppelschichtmembran wurde durch wiederholtes anlegen des 10 mV-Testpulses für 5 min geprüft, ob Kapazität und Leitwert konstant blieben, und das Membransystem damit stabil war. In diesem Fall wurde damit begonnen, die hergestellten α -Synuclein Oligomere (siehe 2.4.2) zu applizieren.

Hierbei wurde in 20 μ l-Schritten der Puffer in der *cis*-Kammer gegen den Aggregationsansatz ausgetauscht, um sich langsam aufbauenden hydrostatischen Druck durch ungleiche Pufferspiegel zu vermeiden. Dazu wurde der Kammerpuffer BLM-fern entommen und das Aliquot des Aggregationsansatzes BLM-nah appliziert. Dadurch sollten Konzentrationsmaxima an α -Synuclein Oligomeren nahe der Membran generiert werden, weshalb auch auf ein Rühren der Lösung mittles Magnetrührern verzichtet wurde. Nach jedem Austausch wurden Kapazität und Leitwert für 5 min durch wiederholtes Anlegen von ± 20 mV-Rechteckspannungen für jeweils 10 s und einen anschließenden 10 mV-Testpuls überwacht. Erhöhte sich der Leitwert dabei nicht über den Schwellenwert von 70 pS, ab dem von einer Membranschädigung auszugehen ist (siehe 3.3.1), wurde der nächste Puffer-austausch vorgenommen, bis der gesamte Aggregationsansatz appliziert war.

Erhöhte sich der Leitwert über den Schwellenwert, wurde eine Schädigung der Lipid-Doppelschichtmembran angenommen und automatisch ein standardisiertes Messprotokoll gestartet (siehe 2.4.1).

-60/-50/-40/-30/-20/-10/0/+10/+20/+30/+40/+50/+60 mV

5 x -40 mV

5 x +40 mV

-60/-70/-80/-90/-100/-110/-120 mV

5 x -80 mV

+60/+70/+80/+90/+100/+110/+120 mV

5 x +80 mV

Das wiederholte Anlegen der Spannungen von ± 40 und ± 80 mV begründet sich aus der Beobachtung in Pilotexperimenten, dass hohe Spannungen (± 80 mV) bei der Charakterisierung der Membranschädigung durch α -Synuclein Oligomere besonders interessant sein könnten (siehe 3.3.3). Um ähnlich solide Daten auch in mittleren Spannungsbereichen gewinnen zu können wurden auch bei ± 40 mV wiederholte Messungen vorgenommen.

2.4.4 Charakterisierung in Abhängigkeit von den verfügbaren Kationen

Nachdem die Membranschädigungen zunächst unter Standardpufferbedingungen (250 mM KCl, 10 mM Mops, pH=7,2) charakterisiert wurden, wurde ein Pufferaustausch vorgenommen. Dazu wurde der Kammerpuffer über das puffer-gefüllte Spritzensystem mit etwa 20 Volumen 250 mM NaCl, 10 mM Mops, pH=7,2 mit einer Geschwindigkeit von 7,2 ml/min perfundiert. Ziel war es dabei, die Membran zu erhalten, um diese auf den Leitwert unter Anwesenheit eines anderen Kations und sonst gleichen Bedingungen zu charakterisieren.

War die Membran nach Pufferaustausch noch intakt und der Leitwert noch über den Schwellenwert erhöht, wurde das gleiche standardisierte Messprotokoll wie unter Standardpufferbedingungen gestartet, und die gleiche Schädigung unter dem neuen Puffer charakterisiert.

2.4.5 Pharmakologische Inhibition der Porenbildung

Um zu prüfen, ob die Aggregationsinhibitoren, die sich in der Einzelmolekülspektroskopie als wirksam erwiesen hatten, einen Einfluss auf die Porenbildung zeigen und damit gleichsam zu bestätigen, dass der Effekt von α -Synuclein auf die Membran vom Aggregationslevel abhängt, wurde in einem weiteren Experiment der Einfluss der Co-Inkubation der auf Einzelmolekülebene charakterisierten Aggregationsinhibitoren auf die Porenbildung untersucht.

Dazu wurden 2,1 μ M α -Synuclein mit 1 % (v/v) DMSO und 20 μ M Fe^{3+} in Gegenwart von anle138b, anle138c oder Baicalein für 72 h bei RT inkubiert (siehe Abb. 2.3). Die mittlere α -Synuclein Konzentration wurde gewählt, da sich die Porendetektion hier scheinbar im „dynamic range“ befand (siehe Abb. 3.10) und somit messbar in beide Richtungen zu beeinflussen sein sollte. Als Referenz wurde der Aggregationsansatz

ohne Inhibitoren verwendet. Beide Gruppen wurden wie unter 2.4.3 beschrieben auf Porenbildung untersucht.

2.5 Biologische Relevanz *in vivo*

2.5.1 Eisenbestimmungen im Hirngewebe

Um zu testen, ob sich porenbildende Oligomere *in vitro* unter physiologischen Bedingungen bilden, wurden Aggregationsbedingungen gewählt, die physiologische Bedingungen simulieren sollten. Da der Eisenspiegel beim Menschen mit dem Alter ansteigt und die Gesamteisenkonzentration bei PD-Patienten zusätzlich erhöht ist (siehe 1.3.3), wurde zunächst der Eisenspiegel im Gehirn von jungen WT-Mäusen gemessen. Dabei war die Idee, dass die dort gemessenen Konzentrationen eher die untere Grenze des Bereiches festlegen sollte, innerhalb dessen sich die physiologische Eisenkonzentration bewegt.

Dazu wurden C57/BL6-Mäuse ab einem Alter von 5 Wochen diätisch mit einem Spezialfutter gefüttert, das definierte Konzentrationen an dreiwertigen Metallionen enthielt. Konkret bekamen die Mäuse 60 mg Fe^{3+} /kg Futter, was laut Hersteller etwa der Konzentration im Futter für die Standardtierhaltung entsprach (Sniff, Soest). Im Alter von 12 Wochen, wurden die Mäuse entnommen und transkardial perfundiert, um blutleeres Hirngewebe zu gewinnen. Dieses wurde im Vergleich zu einer Serumprobe hochdruckverascht und die Konzentration an Eisenionen mittels Massenspektrometrie ermittelt.

2.5.1.1 Transkardiale Perfusion

Die Mäuse wurden initial mittels intraperitonealer Injektion von 10 $\mu\text{l/g}$ Körpergewicht einer Lösung aus 13 % (v/v) Ketamin, 13 % (v/v) Xylazin und 6 % (v/v) Acepromazin in 0,9 % (v/v) NaCl-Lösung anästhesiert. Die Anästhesie während des Eingriffes geschah über Inhalationsnarkose mit 5 % (v/v) Isofluran. Durch Auslösen des Zwischenzehreflexes wurde eine ausreichende Analgosedierung sichergestellt.

Nach Betäubung des Tieres wurde die Thoracotomie vorgenommen, wobei darauf geachtet wurde, Zwerchfell und die großen Bauchfellgefäße intakt zu lassen. In den linken Ventrikel des noch schlagenden Herzens wurde eine Venenverweilkanüle

gesetzt, über die mittels Perfusorpumpe serologische Kochsalzlösung (0,9% v/v) mit 10 IE/ml Heparin infundiert wurde. Der Efflux geschah über Durchtrennung der Vena cava caudalis und wurde bis zum Sistieren der Herzaktivität fortgesetzt. Auf ein Infundieren von Paraformaldehyd o.ä. wurde im Vergleich zu anderen Arbeiten verzichtet, da das Gewebe nicht fixiert, sondern lediglich blutleer werden sollte [155, 156].

Sofort nach Durchtrennung der Vena cava wurde mittels einer Pasteurpipette Vollblut aus dem Thorax gewonnen, nach Möglichkeit mindestens 200 µl. Durch Inkubation für 30 min bei RT und anschließende Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 1500 g wurde Blutserum bei gleichzeitiger Verhinderung der Hämolyse gewonnen. Dies diente dem Vergleich von Blut- und Gewebespiegeln.

Nach cervicaler Dislokation wurde der Schädel des Tieres eröffnet und eine Hemisphäre des Gehirns für den Gewebeaufschluss präpariert. Diese wurde in einer vierstufigen Waschreihe mit 50 mM Tris-HCl, pH=7,0 äußerlich von Blut befreit.

2.5.1.2 Hochdruckveraschung

Zur Aufbereitung der biologischen Gewebeproben wurde der Hochdruckverascher HPA-S verwendet (Anton Paar, Graz, Österreich). Dabei werden die Proben unter hohem Druck und bei hoher Temperatur durch einen nasschemischen Säureaufschluss vollständig mineralisiert. Der Gehalt an Spurenelementen kann anschließend mittels Massenspektrometrie bestimmt werden [157-160].

Dazu wurden die Gewebeproben in Quarzgefäße eingewogen, die zuvor mit Königswasser (aus konzentrierter Salz- und Salpetersäure im Verhältnis 3:1, Merck) bei 35 °C für 15 min im Ultraschallbad gereinigt wurden. Die Gehirnhemisphären wurden dazu jeweils vollständig eingewogen, bzw. jeweils 200 µl Serum verwendet. Als Leerprobe wurden 200 µl H₂O verwendet, das über ein Milli-Q Synthesis A10-System aufbereitet wurde (Millipore). Nach Angaben des Herstellers für den Aufschluss biologischer Proben, wurden allen Proben jeweils 2 ml 65 % HNO₃ und 500 µl 20 % HCl beigelegt, und die Probenträger mit Quarzdeckeln und Teflonband (Anton Paar) hermetisch versiegelt.

Der Aufschluss der Proben geschah unter 100 bar N₂-Atmosphäre bei 260 °C für 90 min. Anschließend wurde das Volumen der Proben bestimmt (in der Regel 2,5 ml) und mit Millipore-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 5 ml aufgefüllt. Die Analyse der

enthaltenen Spurenelemente geschah mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (engl.: inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS; Christine Sternkopf, TU München) [161].

2.5.2 Pharmakologische Inhibition

Um zu testen, ob Substanzen, die sich in vorausgegangenen Untersuchungen als Inhibitoren der Proteinaggregation auf Einzelmolekülebene und der Porenbildung erwiesen hatten, als mögliche Therapeutika im PD-Tiermodell nennenswerte Gewebespiegel erreichen können, wurden Pharmakokinetik-Versuche mit diesen durchgeführt. Dazu wurden C57/BL6-Mäusen nach Narkotisierung mit 5 % (v/v) Isofluran mittels Schlundsonde die jeweilige Substanz in 50 µl Gesamtvolumen verabreicht. Da die Kinetik von anle138b bereits für verschiedene Applikationswege untersucht wurde, wurde es zum Vergleich in derselben Konzentration von 1 mg/50 µl verwendet [152]. Die anderen Substanzen wurden in entsprechenden Mengen verwendet, die zu einer äquimolaren Substanzkonzentration im Applikationsvolumen führten.

Neben anle138b (1,0 mg in DMSO/Speiseöl, 1:5) wurden auch anle138d (1,21 mg in DMSO/Speiseöl, 1:5) und anle253b (0,99 mg in DMSO/Speiseöl, 1:5) verabreicht, ein Derivat das im Vorfeld ebenfalls starke Effekte auf die Proteinaggregation *in vitro* gezeigt hatte [152]. Zusätzlich wurden in Anlehnung an frühere Versuche jeweils zwei Tieren 0,2 mg anle138b bzw. 1,0 mg anle138c gelöst in 10 µl DMSO in 200 mg Erdnussbutter vermengt verabreicht [152].

Nach 1, 2, 4, und 8 h wurden jeweils zwei Tiere entnommen und ätherbetäubt. Nach Überprüfung einer ausreichend tiefen Narkose durch Auslösen des Zwischenzehreflexes wurde eine Blutprobe mittels Pasteurpipette aus der Leistenvene gewonnen. Diese wurde nach 30 min Inkubation bei RT für 15 min bei 4 °C und 1500 g zentrifugiert, um Serum bei gleichzeitiger Verhinderung der Hämolyse zu gewinnen. Das Volumen wurde bestimmt und das Serum über flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Direkt nach der Blutentnahme wurde das narkotisierte Tier mittels cervicaler Dislokation euthanasiert und verschiedene Organe zur Bestimmung der Gewebespiegel entnommen. Dazu gehörten eine Gehirnhemisphäre, ein Leberlappen, die Milz und eine Niere. Alle Organe wurden in einer vierstufigen Waschreihe in 50 mM

Tris-HCl, pH=7,0 oberflächlich von Blut und evtl. Kontaminationen mit Substanz befreit. Anschließend wurde das Gewicht bestimmt und die Organe über flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Analyse der Gewebeproben erfolgte durch Massenspektrometrie nach Auftrennung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: high performance liquid chromatography, HPLC; Sergey Ryazanov, Universität Göttingen) [162].

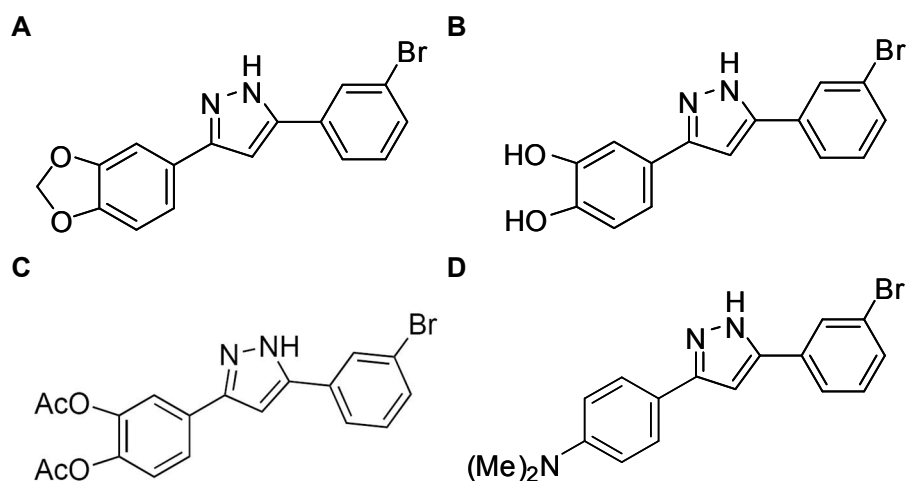


Abb 2.5: Strukturformeln der 3,5-Diphenyl-Pyrazole anle138b, anle138c, anle138d und anle253b (A-D).

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung von rekombinantem α -Synuclein

Die Sequenzierung der aufgereinigten Plasmid-DNA der transformierten Bakterien zeigte eine Übereinstimmung von 99 % mit humanem α -Synuclein. Lediglich der Einzelbasenaustausch an Stelle 136 (TAT/TAC, kodiert beides für Tyrosin) für die optimierte Nutzbarkeit in *E. coli*, sowie eine weitere Punktmutation an Stelle 105, die aber ebenfalls „silent“ war (GAG/GAA, kodiert beides für Glutamat), waren nachweisbar.

```
GENE ID: 6622 SNCA | synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor) [Homo sapiens]

Score = 755 bits (836), Expect = 0.0
Identities = 421/423 (99%), Gaps = 0/423 (0%)
Strand = Plus/Plus

Query 58 ATGGATGTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAG 117
          |||
Sbjct 218 ATGGATGTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAG 277

Query 118 AAAACCAAACAGGGTGTGGCAGAAGCAGCAGGAAAGACAAAAGAGGGTGTCTCTATGTA 177
          |||
Sbjct 278 AAAACCAAACAGGGTGTGGCAGAAGCAGCAGGAAAGACAAAAGAGGGTGTCTCTATGTA 337

Query 178 GGCTCCAAAACCAAGGAGGGAGTGGTGATGGTGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCAAAA 237
          |||
Sbjct 338 GGCTCCAAAACCAAGGAGGGAGTGGTGATGGTGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCAAAA 397

Query 238 GAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGACGGGTGTGACAGCAGTAGCCCAGAAG 297
          |||
Sbjct 398 GAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGACGGGTGTGACAGCAGTAGCCCAGAAG 457

Query 298 ACAGTGGAGGGAGCAGGGAGCATTGCAGCAGCCACTGGCTTTGTCAAAAAGGACCAGTTG 357
          |||
Sbjct 458 ACAGTGGAGGGAGCAGGGAGCATTGCAGCAGCCACTGGCTTTGTCAAAAAGGACCAGTTG 517

Query 358 GGCAAGAATGAAGAGGGAGCCCCACAGGAAGGAATTCTGGAAGATATGCCTGTGGATCCT 417
          |||
Sbjct 518 GGCAAGAATGAAGAGGGAGCCCCACAGGAAGGAATTCTGGAAGATATGCCTGTGGATCCT 577

Query 418 GACAATGAGGCTTATGAAATGCCTTCTGAGGAAGGGTATCAAGACTATGAACCTGAAGCC 477
          |||
Sbjct 578 GACAATGAGGCTTATGAAATGCCTTCTGAGGAAGGGTATCAAGACTACGAACCTGAAGCC 637

Query 478 TAA 480
          |||
Sbjct 638 TAA 640
```

Abb. 3.1: Sequenzierung der aufgereinigten Plasmid-DNA. Das transgen trug mit 99 % Übereinstimmung humanes Synuclein. Lediglich zwei „silent mutations“ an den Stellen 105 und 136 (in rot) waren nachweisbar.

Bei der Elution des Proteins von der Anionentauschersäule mittels eines linearen Hochsalzgradienten zeigte sich ein typisches Laufprotokoll: ab etwa 45-50 % Hochsalzpuffer wurde das Protein von der Säule gewaschen, erkennbar am korrespondierenden *Peak* in der UV-Absorption. Ab etwa 60 % Hochsalzpuffer sank die UV-Absorption wieder ab, um bei 100 % wieder stark anzusteigen.

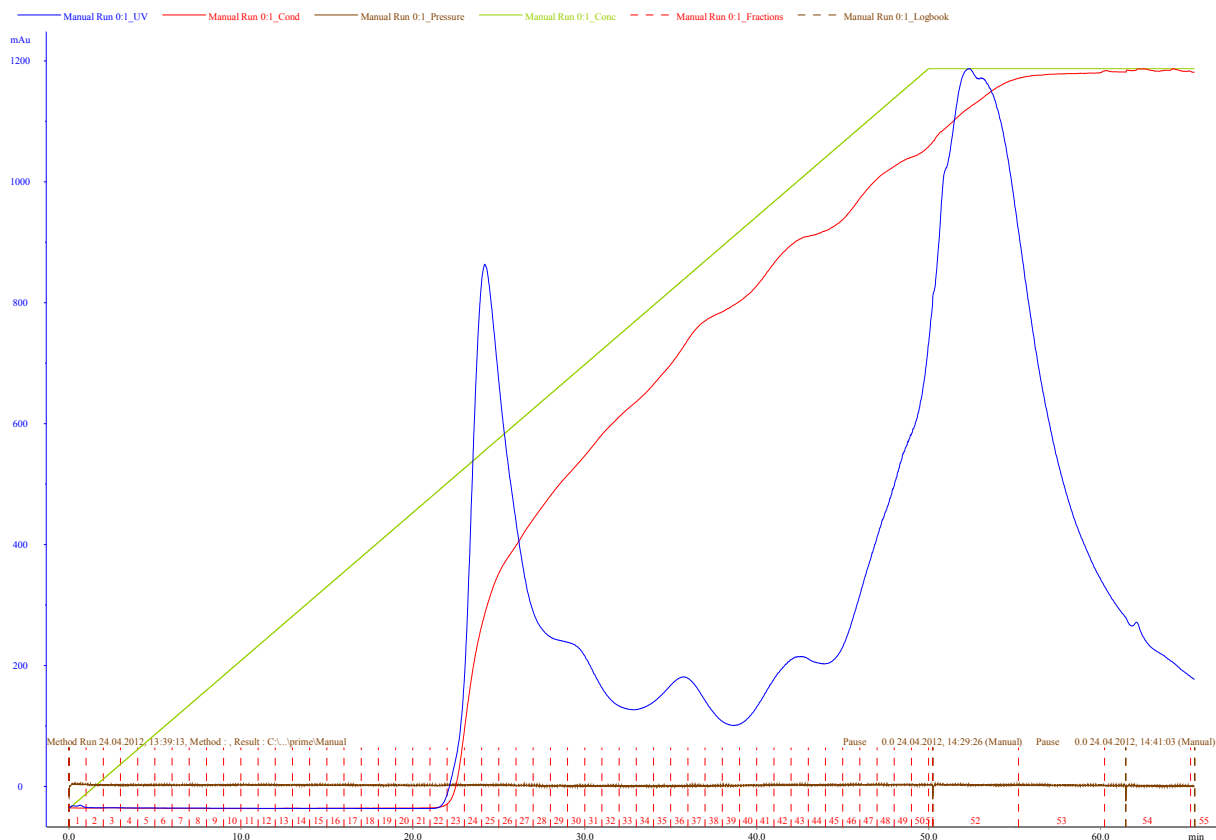


Abb. 3.2: Typisches Laufprofil nach Elution von der Anionentauschersäule mittels Hochsalzgradient. Bei etwa 45 % des linearen Salzgradienten (grün) fangen Leitwert (rot) und UV-Absorption (blau) an anzusteigen. Die UV-Absorption fällt ab etwa 60 % wieder ab, um bei 100 % nochmals anzusteigen. Der Leitwert steigt ab 45 % quasi kontinuierlich mit der Salzkonzentration an.

Mit Proben aus den Fraktionen 23-36 (hier exemplarisch für mehrere Aufreinigungen) wurde der erste, scharfe *Peak* vollständig ausgeschnitten, gel-elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel Coomassie-Blau gefärbt. Auf eine Analyse der Fraktionen die den zweiten *Peak* enthielten wurde verzichtet, da frühere Versuche konsistent zeigten, dass diese kein α -Synuclein enthielten. Nach Auswertung des Coomassie-Gels wurden die Fraktionen 24-30 für die Gelfiltration zusammengeführt, um in diesen schwerere Proteine und präformierte α -Synuclein Aggregate von den Monomeren abzutrennen.

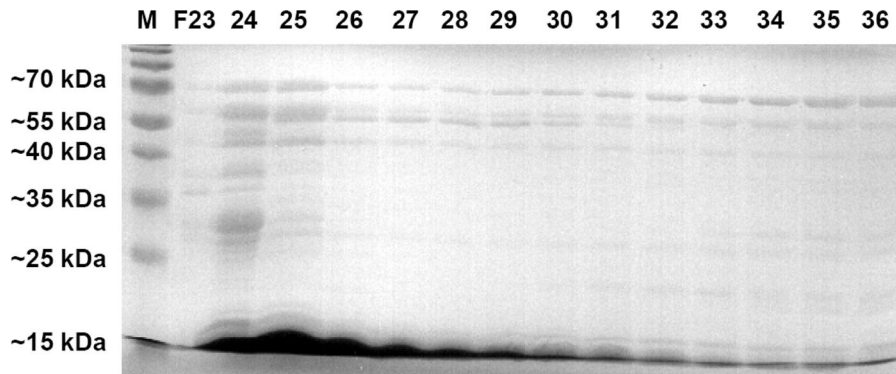


Abb. 3.3: Coomassie-Blau Färbung der gel-elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen aus der Protein-Elution. Dargestellt ist die Auftrennung der Proben aus den Fraktionen 23-36. Die Fraktionen 24-30 weisen jeweils eine deutliche Protein-Bande auf Höhe 14-17 kDa, aber z.T. auch deutliche Banden im höhermolekularen Bereich.

Nach Einengung des Volumens mittels Zentrifugation in Vivaspın-Säulen, wurde das aufgereinigte Protein mit 50 mM Tris-HCl, pH=7,0 über eine Gelfiltrationssäule laufen gelassen, um andere Proteine und präformierte Aggregate nach Größe abzutrennen. Dabei ergab sich wiederum ein typisches Laufprofil mit einem deutlichen *Peak* über mehrere Fraktionen in der UV-Absorption, der mit einem Abfall im Leitwert der Säule korrelierte.

Ein Coomassie-Blau gefärbtes Gel der Fraktionen 8-20 aus der Gelfiltration zeigte eine starke Protein-Bande auf Höhe 14-17 kDa in den Fraktionen 11-16. Diese wurden für das weitere Vorgehen zusammengeführt.

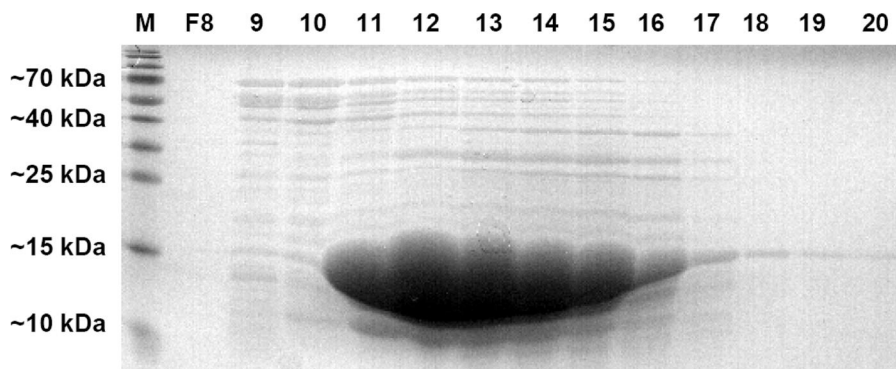


Abb. 3.4: Coomassie-Blau Färbung der gel-elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen aus der Gelfiltration. Dargestellt ist die Auftrennung der Proben aus den Fraktionen 8-20. Die Fraktionen 11-16 weisen eine deutliche Protein-Bande auf Höhe 14-17 kDa.

Mittels BCA-Assay wurde die Konzentration der zusammengeführten Fraktionen aus der Gelfiltration mit etwa 6 mg/ml bestimmt. Die Proteinlösung wurde daher zunächst 1:5 in 50 mM Tris-HCl, pH=7,0 verdünnt, die Konzentration nochmals bestimmt und dann auf 1 mg/ml End-Konzentration eingestellt (siehe Abb. 3.5). Um die Qualität der

Proteincharge abschließend zu prüfen, wurde ein MALDI-TOF Massenspektrogramm angefertigt, welches im Wesentlichen nur einen klaren *Peak* bei 14,4 kDa, dem Molekulargewicht monomeren α -Synucleins zeigte (siehe Abb. 3.6).

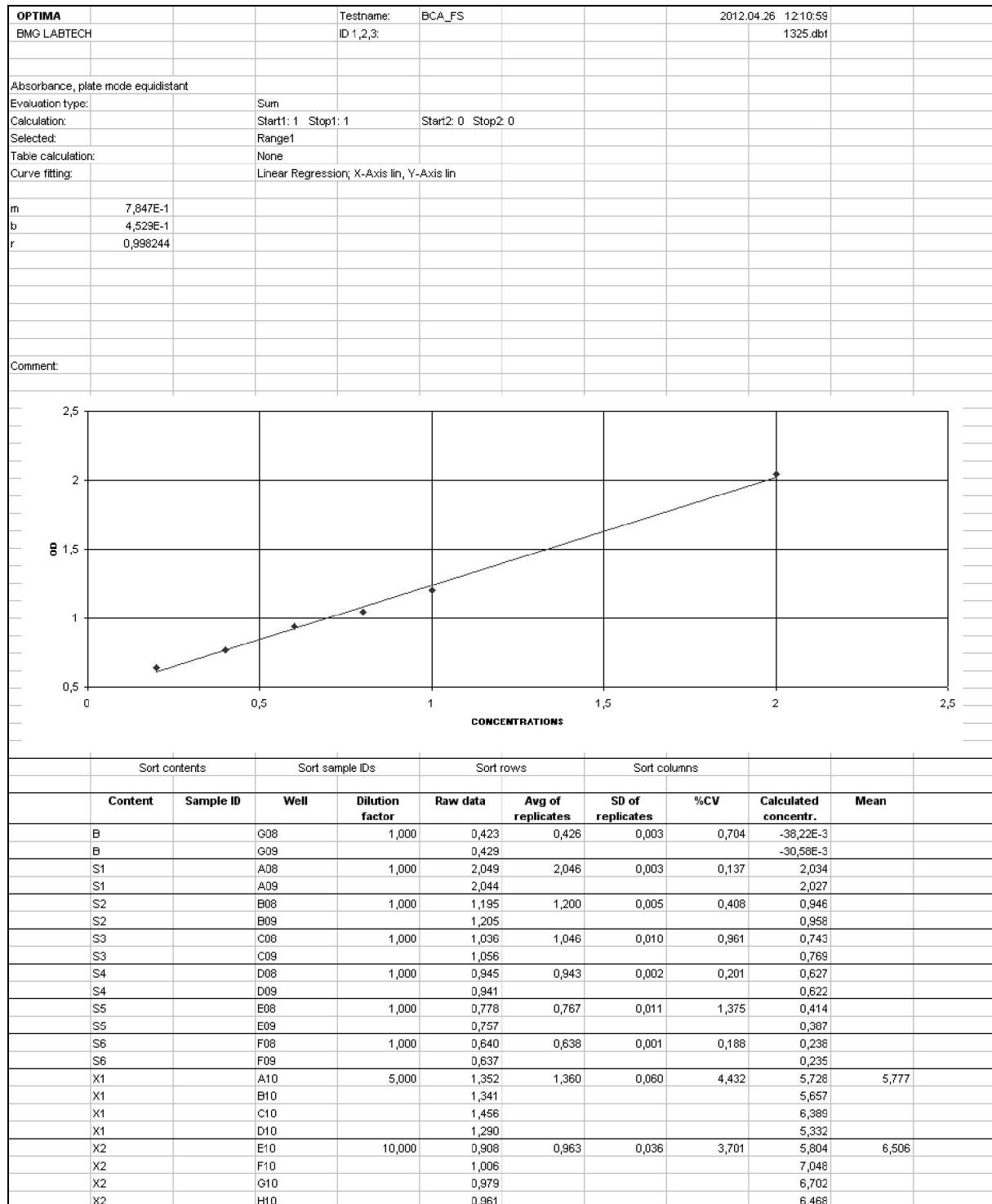


Abb. 3.5: Auswertung des BCA-Assays zur Proteinkonzentrationsbestimmung. Dargestellt sind die Eichkurve der BSA-Verdünnungsreihe (im Doppelansatz), sowie die relativ dazu berechnete Konzentration der Proteinlösung für zwei Verdünnungen, jeweils in Vierfachreplikaten. Dabei ergab sich eine Konzentration an α -Synuclein von im Mittel 6 mg/ml.

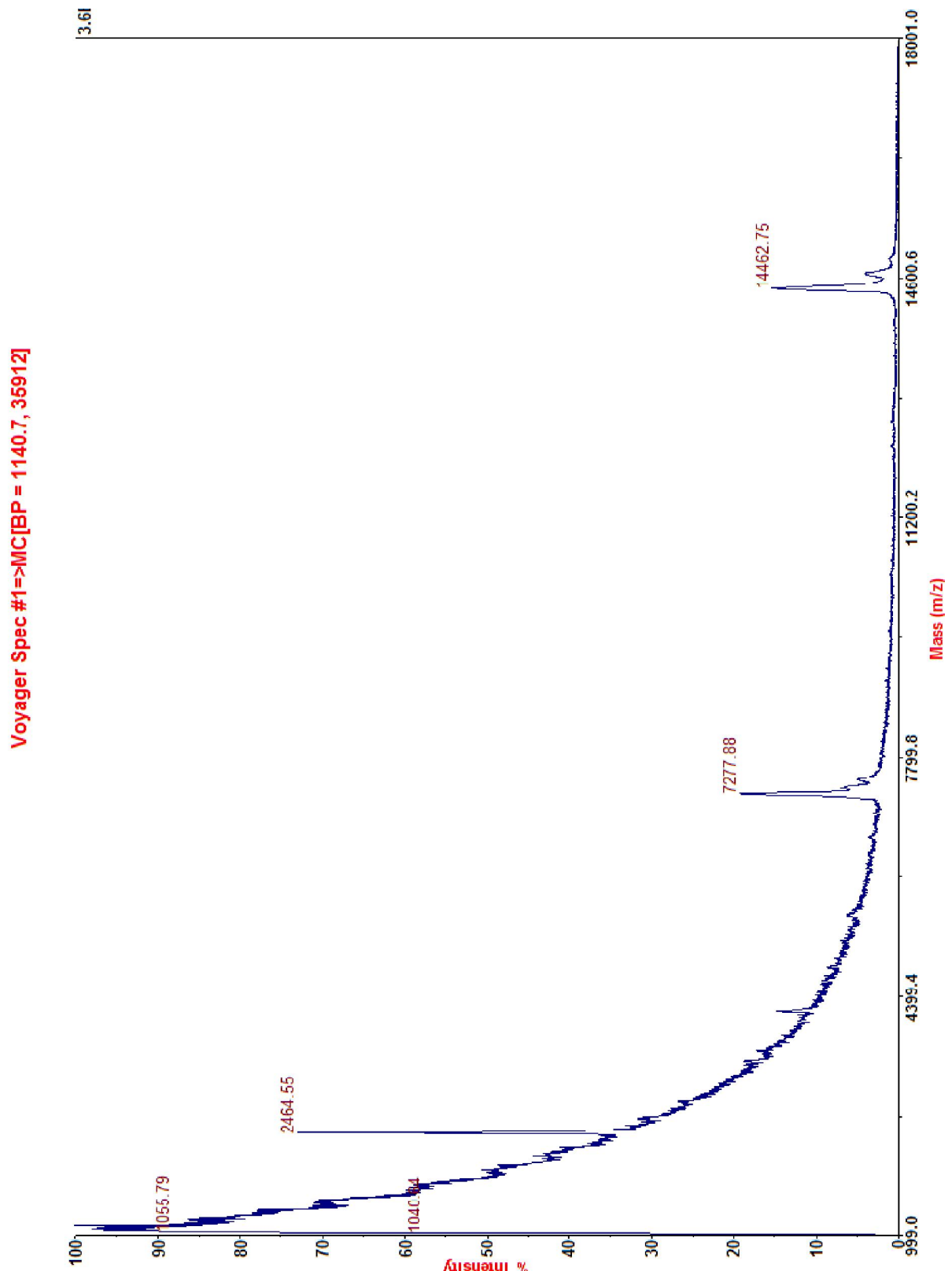


Abb. 3.6: MALDI-TOF Massenspektrogramm des aufgereinigten rekombinanten α -Synucleins. Im Wesentlichen sind nur der α -Synuclein Peak bei 14,4 kDa und das doppelt ionisierte α -Synuclein bei der halben molekulare Masse sichtbar. Andere Proteine sind nur im niedermolekularen Bereich sichtbar, wobei in dem semi-quantitativen Spektrogramm die Fläche unter dem Peak nicht der Konzentration entspricht.

3.2 α -Synuclein Oligomere auf Einzelmolekülebene

Wie bereits beschrieben, zeigte die Inkubation mit 1 % DMSO und 10 μM Fe^{3+} einen starken Einfluss auf die *de novo*-Aggregation zweifarbig fluoreszenzmarkierter α -Synuclein Monomere [86, 90]. Das zeigt sich in der Detektion hoch intensiver Partikel, mit einem koinzidenten Signal in beiden Kanälen. Die Co-Inkubation mit Aggregationsinhibitoren wie Baicalein oder anle138c blockte die Aggregation quasi vollständig. Die Verwendung von anle138b in einer quasi-logarithmischen Verdünnungsreihe zeigte eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung in der Inhibition der Oligomerbildung. Während 1 μM bereits zu einer leichten Reduktion um im Mittel ~ 20 % führte, konnte die Oligomerbildung durch den Einsatz von 3 bzw. 10 μM anle138b hochsignifikant um ~ 50 bzw. ~ 70 % reduziert werden ($p < 0,0001$). Höhere Konzentrationen führten zum Präzipitieren der Substanz in wässriger Lösung.

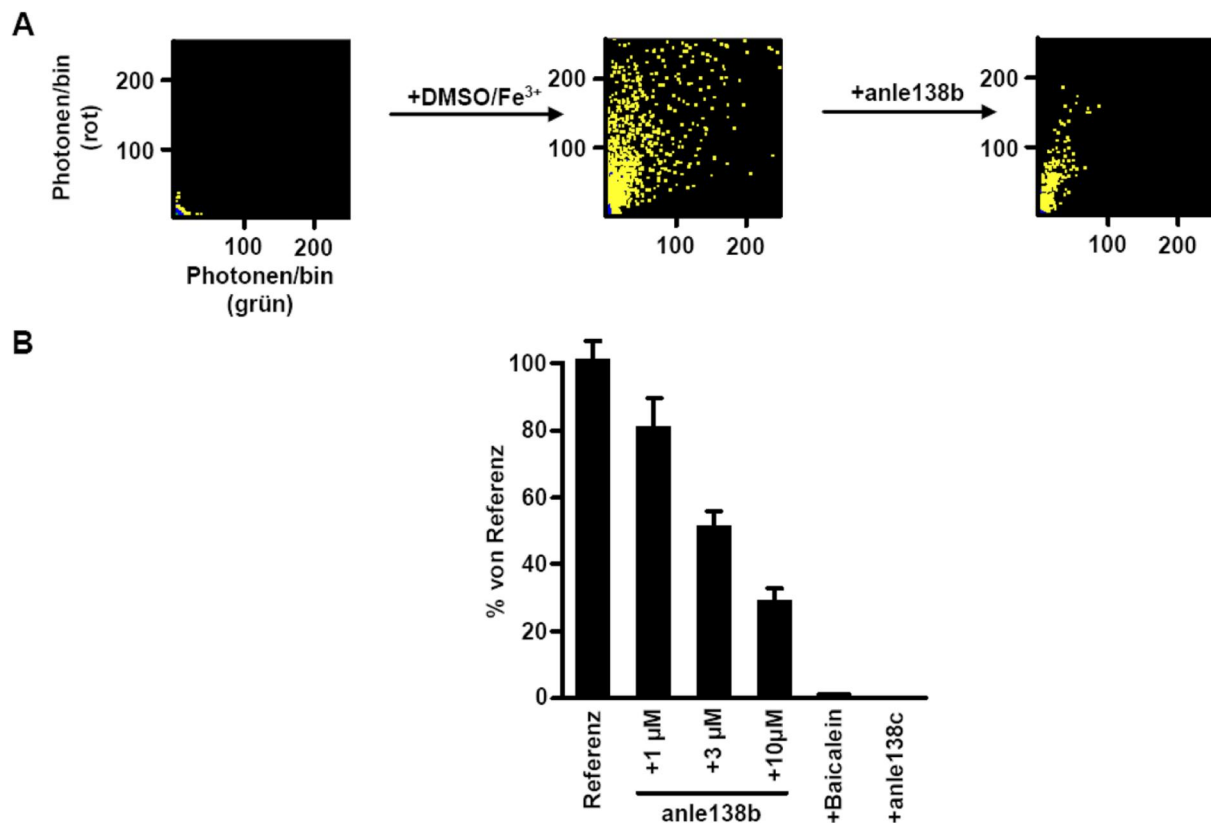


Abb. 3.7: Oligomerbildung und -inhibition *in vitro* auf Einzelmolekülebene. **A** Dargestellt sind die 2D-Intensitätsverteilungshistogramme, aus gescannten Messungen nach 3 h Inkubation. Die Formierung großer Oligomere ist durch hoch intensive Partikel mit koinzidentem Signal in beiden Kanälen auf Einzelmolekülebene detektierbar. Diese Formierung wird durch Co-Inkubation mit anle138b geblockt. **B** Durch Zugabe von 1 (N=4), 3 (N=5) oder 10 μM anle138b (N=7), kann die Bildung dieser Oligomere reduziert werden ($p < 0,0001$). Dargestellt ist die durchschnittliche Inhibition ($\pm\text{SEM}$) in % bezogen auf die Referenz (N=7). Baicalein und anle138c wurden in der Konzentration 10 μM verwendet und blockierten die Oligomerbildung nahezu vollständig (jeweils N=1).

3.3 Einfluss von α -Synuclein Oligomeren auf Lipid-Membranen

3.3.1 Etablierung des BLM-Assays

Hinsichtlich der zu verwendenden Apertur erwies sich eine Größe von 120 μm Durchmesser als optimaler Kompromiss bezüglich maximaler aktiver Fläche, BLM-Stabilität und Reproduzierbarkeit mittels Funkenstrecke durch den Hersteller (Ionovation). Kapazität und Leitwert schwankten jeweils um weniger als 10 % und die Membran blieb bis zu 1,5 h stabil. In den Pilotexperimenten lagen die Werte der elektrophysikalischen Kenngrößen in diesem System typischerweise im Bereich von 60-80 pF für die Kapazität und bei 8-10 pS für den Leitwert intakter Membranen, was einem elektrischen Widerstand von $>100\text{ G}\Omega$ entspricht. α -Hemolysin zeigte dabei eine Porenbildungswahrscheinlichkeit von 75 % ($N=4$). 70 pS erwiesen sich als guter Schwellenwert für den Leitwert, ab dem eine spezifische Schädigung der Membran angenommen und automatisch mittels des standardisierten Messprotokolls charakterisiert werden konnte (siehe 2.4.1).

Zudem erwies sich das verwendete System als geeignet, Poren auf Einzelkanalebene zu charakterisieren, da sich der Stromfluss durch eine einzelne α -Hemolysinpore deutlich vom geringen Hintergrundrauschen abhob (siehe 2.4.1).

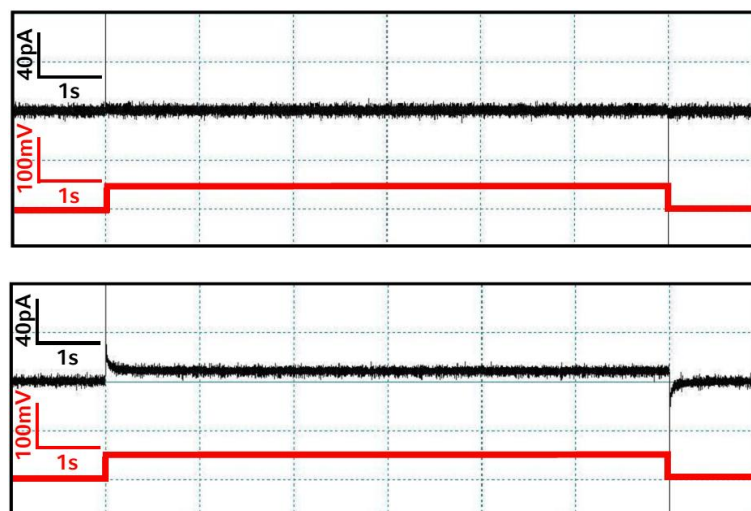


Abb. 3.8: Typische Spannungs-Stromkurven vor und nach Membranschädigung. Während sich der Stromfluss (schwarze Spur) über eine intakte Membran beim Anlegen einer 60 mV-Rechteckspannung für 10 s (rote Spur) kaum vom Hintergrundrauschen bei 0 mV unterscheidet (oben; $I=480\text{ fA}$, $G=8\text{ pS}$), ist dieser nach Zugabe von α -Hemolysin deutlich erhöht (unten; $I=12\text{ pA}$, $G=230\text{ pS}$).

3.3.2 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Porendetektion

In einem ersten Pilotversuch wurden die Aggregationsbedingungen hinsichtlich einer maximalen Detektionsrate der Schädigung der Lipid-Doppelschichtmembranen optimiert. Dabei wurde das porenbildende Toxin von *Staphylococcus aureus*, α -Hemolysin als Positiv- und der proteinfreie Puffer des Aggregationsansatzes als Negativkontrolle verwendet.

Die Porendetektion korrelierte dabei sowohl mit der Inkubationszeit des Ansatzes bei RT, als auch mit der eingesetzten Proteinmenge. Nicht-inkubiertes, monomeres α -Synuclein führte dabei nie zur Schädigung der Lipid-Doppelschichtmembranen, genauso wie α -Synuclein das für 4 bzw. 24 h bei RT in Gegenwart von 1 % DMSO und 20 μM Fe^{3+} inkubiert wurde (jeweils $N=4$). Nach 48 h führten 33 % der Aggregationsansätze ($N=9$) zu einer Erhöhung des Leitwertes der Membran über den Schwellenwert. Die Detektionsrate der Schädigung erlangte nach 72 h Inkubation bei RT ihr Maximum von 60 % ($N=10$), und fiel nach 96 h wieder deutlich auf 30 % ($N=10$) ab.

Proteinfreier Puffer mit 1 % DMSO und 20 μM Fe^{3+} führte nach allen gemessenen Inkubationszeiten nie zu einer Erhöhung des Leitwertes über den Schwellenwert (jeweils $N=4$), während α -Hemolysin in 75 % der Zugaben zu einer Membranschädigung führte ($N=4$).

Darüber hinaus war die Detektionsrate der Membranschädigung auch signifikant von der eingesetzten Proteinkonzentration abhängig ($p \leq 0,0001$). Während 2,1 μM α -Synuclein mit 1 % DMSO und 20 μM Fe^{3+} nach 72 h bei RT zu einer Detektionsrate von etwa 60 % führten ($N=35$), konnte diese auf über 90 % gesteigert werden, wenn 7,0 μM α -Synuclein verwendet wurden ($N=69$). Für 0,7 μM sank die Detektionsrate auf unter 30 % ($N=8$).

Um den membranschädigenden Effekt von α -Synuclein Oligomeren möglichst effizient charakterisieren zu können, wurden daher alle späteren Experimente (s.u.) mit 7,0 μM Protein und 72 h Inkubation bei RT durchgeführt.

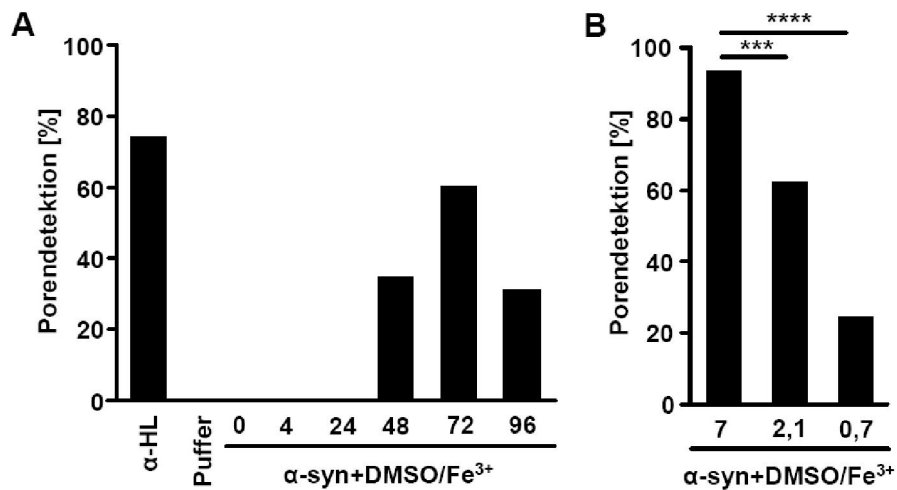


Abb. 3.9: Die Porendetektion ist abhängig von der Proteinkonzentration und der Inkubationszeit. **A** Erst nach 48 h Inkubation bei RT ist eine Porenbildung durch 2,1 μM α -Synuclein in Gegenwart von DMSO und Eisen detektierbar. Nach 72 h ist das Maximum erreicht, eine weitere Inkubation führt zum Abfall der Detektionsrate. Die proteinfreie Pufferreferenz führte nach allen gemessenen Inkubationszeiten nie zur Porendetektion, α -Hemolysin (α -HL) führte in 75 % der Applikationen zur Porendetektion. **B** Während 2,1 μM α -Synuclein in Gegenwart von DMSO und Eisen wieder zu einer Detektionsrate von 60% führten (siehe auch Abb. 3.9 A) konnte diese durch Variation der eingesetzten Proteinmenge signifikant in beide Richtungen verschoben werden. 7,0 μM führten in über 90 % der Applikationen zu einer detektierbaren Porenbildung, 0,7 μM in weniger als 30 % ($p \leq 0,0001$).

3.3.3 Charakterisierung des Effektes auf elektrophysiologische Membraneigenschaften

In insgesamt 124 Experimenten wurden 81 Membranschädigungen mit dem standardisierten Messprotokoll charakterisiert. Dabei zeigte sich bei Anlegen der Spannungsrampe ein erhöhter Stromfluss im Vergleich zu intakten Membranen. Beim Anlegen der Rechteckspannungen zeigte sich zudem, dass der Stromfluss bei konstanten Spannungsreizen nicht konstant war, sondern diskrete Änderungen aufwies. Da sich diese als stufenförmige, sprunghafte Änderungen im Stromfluss, bzw. in dem daraus resultierenden Leitwert über die Membran darstellten, wurden sie mit dem englischen Ausdruck „Steps“ beschrieben.

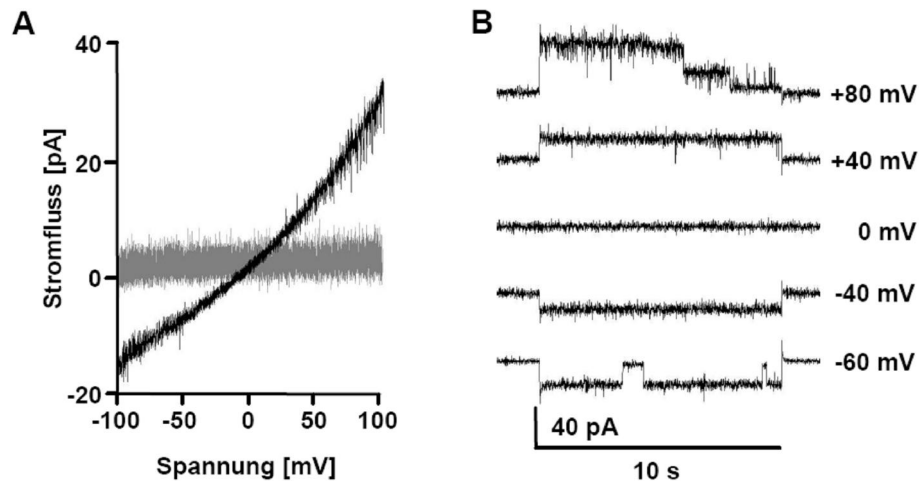


Abb. 3.10 Die Erhöhung des Stromflusses über die Membran weist definierte Änderungen auf.
A Bei Anlegen der Spannungsrampe kommt es nach Porendetektion zu einem deutlich erhöhten Stromfluss (schwarze Stromspur) im Vergleich zu einer intakten Membran (graue Stromspur). **B** Bei Anlegen verschiedener jeweils konstanter Rechteckspannungen fällt zudem auf, dass der Stromfluss nicht konstant ist, sondern vielmehr definierte, stufenartige Änderungen, sog. „Steps“ aufweist.

Um zu klären, ob dies auf eine unspezifische Erhöhung des Leitwertes oder die Bildung distinkter Poren zurückzuführen ist, wurden diese *Steps* im Leitwert hinsichtlich Häufigkeit und Art der Änderung genauer untersucht.

Dazu wurde in einem Matlab-basierten Analyseprogramm aus den gemessenen Stromspuren und den angelegten Spannungen der Leitwert über die Membran bestimmt. Die einzelnen distinkten Änderungen im Leitwert wurden dann mit hoher zeitlicher Auflösung hinsichtlich ihrer Häufigkeit bei den unterschiedlichen Spannungen und, dem jeweils vorliegenden absoluten Leitwert und dem relativen Betrag der Änderung charakterisiert. Der Wert eines *Steps* ergab sich also aus dem jeweils gemessenen Stromfluss vor und nach der Änderung bei gleicher Spannung.

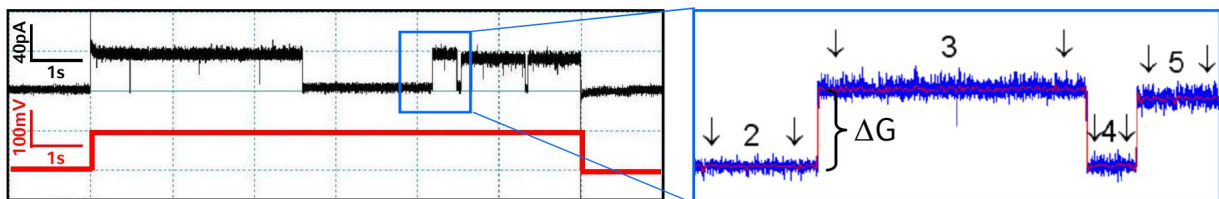


Abb. 3.11: Auswertung einer Spannungs-Stromkurve mit charakteristischen Schalt ereignissen.
 Während einer exemplarisch angelegten 120 mV Rechteckspannung für 10 s (rot) ist der resultierende Stromfluss über die Membran nicht konstant. Die Schalt ereignisse wurden hinsichtlich ihres relativen Einflusses auf den Leitwert und ihrer Häufigkeit bei den verschiedenen Spannungen charakterisiert, sowie alle absolut eingenommenen Leitwertlevel bestimmt. Der Wert des *Steps* z.B. zwischen Zustand 2 und 3 ergab sich mit $\Delta G = (I_3 - I_2)/U$ [pS].

Das Schaltverhalten trat im Mittel mit einem Maximum von etwa einem *Step* pro Sekunde angelegter Spannung auf und war dabei bei unterschiedlichen Spannungen unterschiedlich häufig. Für hohe Spannungen wurden mehr *Steps* verzeichnet als für Spannungen nahe 0 mV und bei positiven Spannungen traten mehr *Steps* auf, als bei negativen. *Steps*, die dabei den Leitwert erhöhten (*Step* G-rauf) und solche, die den Leitwert verringerten (*Step* G-runter) waren dabei etwa gleich häufig, mit einer leichten Dominanz negativer Schaltereignisse für hohe positive Spannungen.

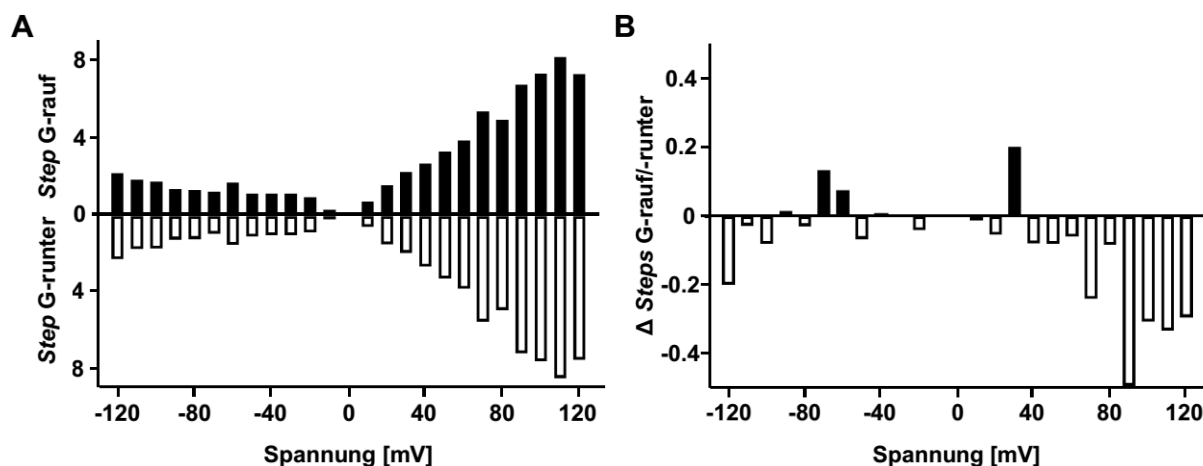


Abb. 3.12: Das Auftreten der Steps ist abhängig von der angelegten Spannung. **A** Häufigkeit des Auftretens von Steps, die den Leitwert der Membran erhöhen (*Step* G-rauf) bzw. senken (*Step* G-runter) bei verschiedenen Rechteckspannungen. Je größer die Spannung, desto mehr Schaltereignisse treten auf und bei positiven Spannungen treten mehr auf, als bei negativen. Das Schaltverhalten ist also asymmetrisch. Dargestellt sind die Schaltereignisse normiert auf die Anzahl der angelegten 10 s-Rechteckspannung. **B** Bildet man die Differenz zwischen Leitwert erhöhenden und senkenden Steps, fällt auf, dass diese quasi gleich häufig auftreten, mit einer leichten Dominanz negativer Schaltereignisse für hohe positive Spannungen.

Da das Schaltverhalten eine deutliche Abhängigkeit von der angelegten Spannung aufwies, wurde auch die Höhe der Änderung des Leitwertes (*Step*-Größe) in Abhängigkeit von der Spannung ausgewertet. Dabei fällt auf, dass ein Histogramm aller gemessenen Steps in Abhängigkeit der angelegten Spannungen zwei distinkte Maxima („Peaks“) aufweist, die symmetrisch um 0 pS verteilt sind, und dass deren Wert von der angelegten Spannung abhängt (siehe Abb. 3.13 A). Dieser Effekt wird verdeutlicht, wenn man lediglich die Maxima der Verteilung (markiert in rot) gegen die angelegte Spannung aufträgt (siehe 3.13 B). Dabei wird eine lineare Korrelation sichtbar. Darüber hinaus wird klar, dass Steps bei positiven Spannungen nicht nur häufiger auftreten als bei negativen (siehe Abb. 3.12), sondern dass der Wert der Änderung des Leitwertes bei positiven Spannungen auch höher ist.

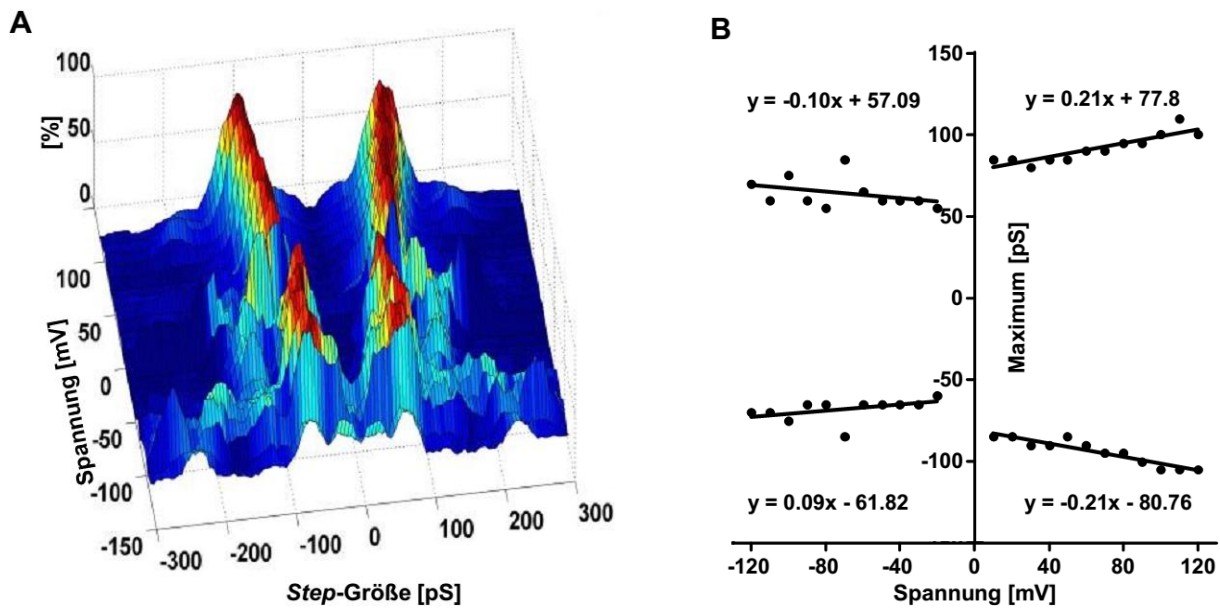


Abb. 3.13: Die Höhe der Steps ist abhängig von der angelegten Spannung. **A** Histogramm aller gemessenen Steps in Abhängigkeit von der Spannung, relativ zu den jeweils am häufigsten gemessenen (markiert in rot, auf 100 % normiert). Die Werte sind symmetrisch um 0 pS verteilt, und dabei von der angelegten Spannung abhängig. **B** Darstellung der Maxima der Verteilung aus A, in Abhängigkeit von der Spannung. Für positive Spannungen ist die Step-Größe höher und positiv linear mit der angelegten Spannung korreliert ($p \leq 0,0001$).

3.3.4 Detaillierte Analyse der Schaltereignisse bei +80 mV

Aufgrund der Spannungsabhängigkeit der Häufigkeit der Steps und da aufgrund des standardisierten Messprotokolls die meisten Daten für Spannungen von +80 mV gesammelt wurden (siehe 2.4.3), wurde das Phänomen detailliert für diese Spannung untersucht.

Dabei wurde die Quantelung eingenommener Leitwertzustände und gemessener Steps deutlicher sichtbar, als bei Betrachtung des Gesamtdatensatzes. Ein Histogramm aller bei einer Spannung von +80 mV eingenommenen Leitwerte weist deutliche Maxima in der Verteilung auf, die sich jeweils um etwa 100 pS unterscheiden. Ein Histogramm der gemessenen Step-Größen weist ebenfalls Peaks bei $\pm \sim 100$ pS, und wesentlich seltener bei Vielfachen davon auf.

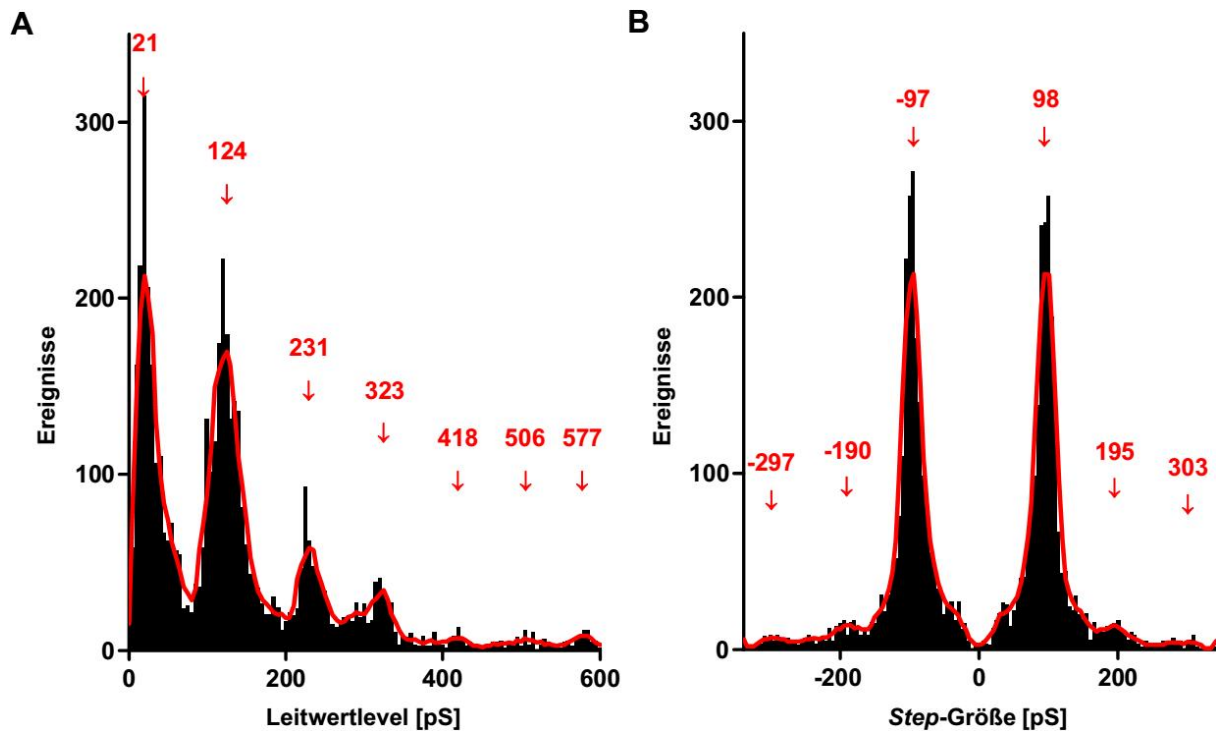


Abb. 3.14: Analyse aller eingenommenen Leitwertlevel und gemessenen Steps bei +80 mV. **A** Histogramm aller eingenommenen Leitwertlevel, aller Experimente mit Porendetektion (N=4435 in 74 Porendetektionen). Hier wird eine gequantelte Verteilung der Leitwertlevel mit einer Quantumeinheit von ~ 100 pS sichtbar. Die rote Linie stellt dabei den gleitenden Mittelwert über 8 Werte dar, die Pfeile markieren die Maxima dieser Verteilung. **B** Ein Histogramm der beobachteten Schaltereignisse zeigt, dass diese ebenfalls eine Quantumeinheit von ~ 100 pS, bzw. Vielfachen davon aufweisen.

Um zu prüfen, ob sich das Gesamtbild auch in individuellen Experimenten wiederfindet, wurden Histogramme der eingenommenen Leitwertszustände und gemessenen *Step*-Größen auch für repräsentative Einzelmessungen angefertigt. Dabei wurde zusätzlich überprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen der gemessenen *Step*-Größe und dem vorherrschenden Leitwert gab. Dabei zeigte sich, dass die *Step*-Größe nicht vom vorherrschenden Leitwert abhängt, dass sich die Maxima der Leitwertsverteilung wieder um den Wert ~ 100 pS unterscheiden, und ebenfalls *Step*-Größen von $\pm \sim 100$ pS und Vielfache davon gemessen wurden. Letztere wurden nur bei entsprechend großen Ausgangsleitwertleveln beobachtet.

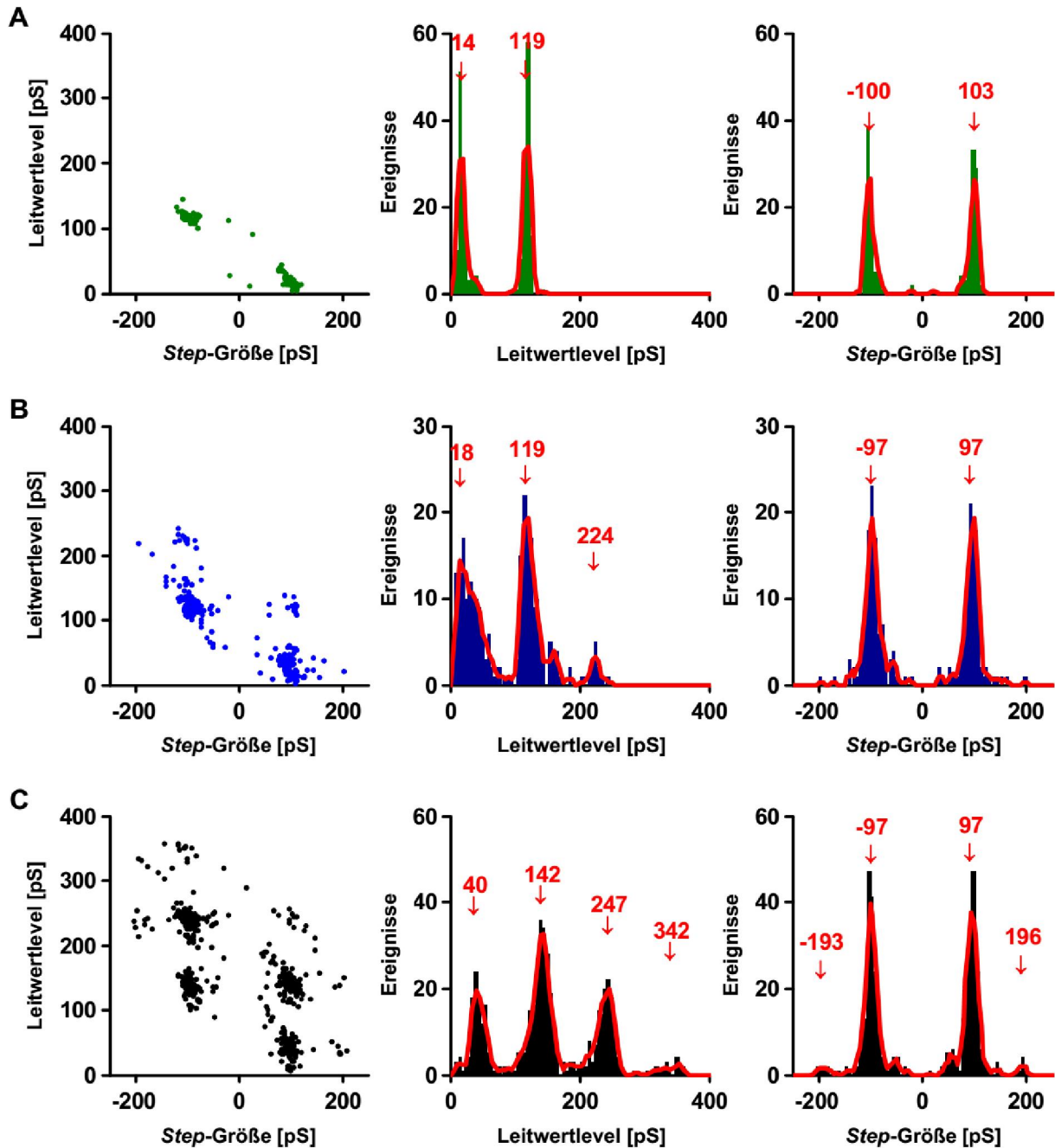


Abb. 3.15: Analyse eingenommener Leitwertlevel und gemessener Step-Größen in drei repräsentativen Einzelexperimenten. **A** Betrachtet man zunächst die Step-Größen in Abhängigkeit vom vorherrschenden Leitwert, bei dem diese auftreten, stellt man fest, dass es keine zufällige Verteilung gibt: Steps von ± 100 pS sind bei allen vorherrschenden Leitwertleveln messbar, während Vielfache davon nur bei entsprechend hohen Ausgangsleveln beobachtet werden. Betrachtet man weiterhin die eingenommenen Leitwerte und die gemessenen Step-Größen, findet sich die Quantumeinheit von ~ 100 pS wieder. Die rote Kurve stellt den gleitenden Durchschnitt über 8 Werte dar, die Pfeile die Maxima der Verteilung. **B** In diesem Experiment werden die eingenommenen Leitwertlevel um einen weiteren, sich wiederum um ~ 100 pS vom vorherigen unterscheidenden Peak erweitert. **C** Im dritten Experiment zeigt sich nicht nur wieder ein weiterer Leitwertlevel, sondern zusätzlich auch eine weitere gemessene Step-Größe von ~ 200 pS.

3.3.5 Abhängigkeit des Leitwertes vom verfügbaren Kation

Um zu prüfen, ob der Leitwert über die Membran nach Schädigung vom im Kammerpuffer verfügbaren Kation abhing, wurde in einem Teil der Experimente der Kammerpuffer nach der standardisierten Charakterisierung der Schädigung unter KCl-Bedingungen gegen äquimolaren NaCl-Puffer ausgetauscht. Dabei zeigte sich, dass die Schädigung der Membran in soweit stabil war, als dass der Leitwert immer noch über den Schwellenwert einer intakten Membran erhöht war und *Steps* nach wie vor mit einer ähnlichen Häufigkeit und Verteilung in Abhängigkeit von der angelegten Spannung auftraten.

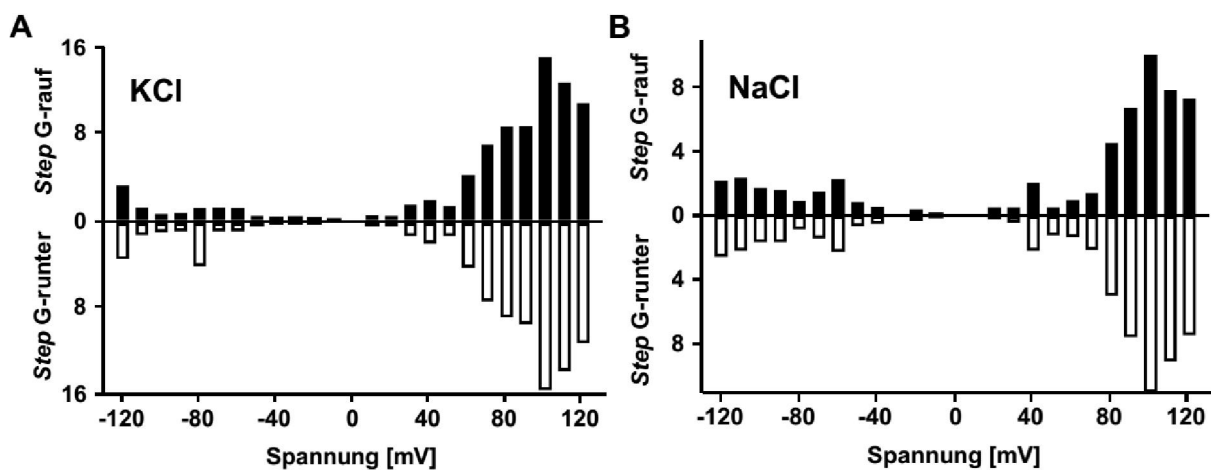


Abb. 3.16: Auftreten von *Steps* vor und nach Pufferaustausch. **A** Verteilung der *Steps* in Abhängigkeit der angelegten Spannung, gemessen bei 9 Porendetektionen, bei denen eine anschließende Charakterisierung nach Pufferaustausch möglich war. Die Verteilung gleicht im Wesentlichen der aller unter Standardpuffer gemessenen *Steps* (siehe Abb. 3.12). **B** Unter NaCl-Puffer sind weiterhin *Steps* in beide Richtungen messbar und auch die Verteilung gleicht der im KCl-Puffer. Die auf die Anzahl angelegter 10 s-Rechteckspannungen normierte Häufigkeit ist etwas geringer als unter Standardbedingungen.

Anschließend wurde die *Step*-Größe vor und nach Pufferaustausch betrachtet. Dabei zeigte sich wiederum, dass die gemessenen *Step*-Größen im KCl-Puffer mit nahezu der gleichen, signifikanten Korrelation linear mit der angelegten Spannung anstiegen, wie im Gesamtdatensatz unter KCl-Bedingung (siehe auch Abb. 3.13 B). Im NaCl-Puffer zeigte sich, dass die *Step*-Größe ebenfalls signifikant mit der angelegten Spannung korrelierte, allerdings negativ. So war die *Step*-Größe für angelegte hohe positive Spannungen im Vergleich zur Standardbedingungen um etwa 25 % reduziert.

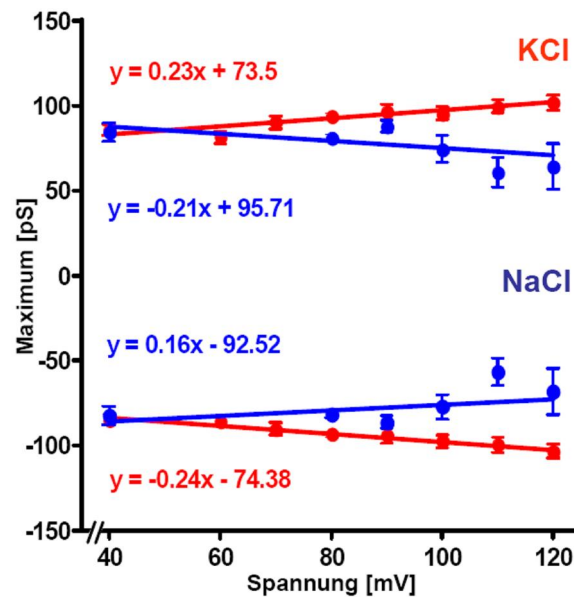


Abb. 3.17: Step-Größen vor und nach Pufferaustausch. Die Maxima der Verteilung der gemessenen *Step*-Größen unter KCl-Bedingungen (rot) zeigen in den zugrundeliegenden 9 Messungen die gleiche lineare Abhängigkeit von der angelegten Spannung wie im Gesamtdatensatz ($p \leq 0,0001$; siehe auch Abb. 3.13 B). Unter NaCl-Puffer (blau) zeigt sich ebenfalls ein linearer Zusammenhang, allerdings korreliert hier die *Step*-Größe negativ mit der angelegten Spannung, sodass die Werte für hohe positive Spannungen deutlich reduziert sind ($p \leq 0,0005$).

3.3.6 Pharmakologische Inhibition der Porenbildung

Um zu prüfen, ob Aggregationsinhibitoren eine negative Wirkung auf die Porendetektionswahrscheinlichkeit haben, wurden diese mit dem Standard-Aggregationsansatz co-inkubiert. Nach Vorversuchen zeigte sich, dass eine anle138b-Konzentration von 10 μM noch unwirksam war, die Porendetektion messbar zu beeinflussen, und die Substanz bei 50 μM bereits begann auszufallen. Die mittlere Konzentration von 25 μM führte dagegen zu einer signifikanten Reduzierung der Porendetektionen. 50 μM anle138c führten zu einer ähnlich starken Inhibition, die jedoch aufgrund der geringeren Stichprobengröße nicht signifikant war. Baicalein wurde in einer Konzentration von 50 μM eingesetzt und zeigte ebenfalls eine signifikante Inhibition der Porenbildung.

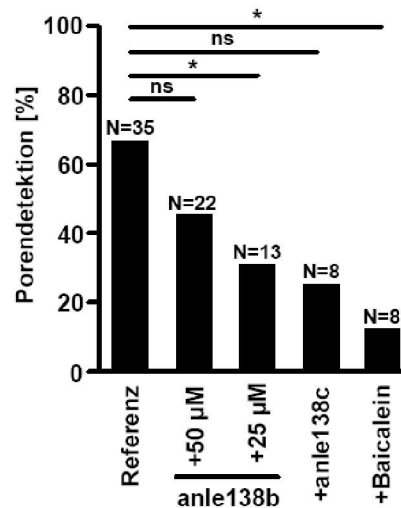


Abb. 3.18: Reduktion der Porendetektion durch Co-Inkubation mit Aggregationsinhibitoren. Durch Inkubation des Aggregationsansatzes mit 25 µM anle138b oder 50 µM Baicalein lässt sich die Porenbildung signifikant reduzieren ($p=0,0458$ für anle138b und $p=0,0130$ für Baicalein).

3.4 Biologische Relevanz *in vivo*

3.4.1 Aggregationsbedingungen

Um zu prüfen, ob sich porenbildende Oligomere unter physiologischen Bedingungen bilden, wurde die Eisenkonzentration im Gewebe von Mäusen bestimmt. Die Analyse der Gewebespiegel von Fe^{3+} in Serum und Gehirn von zwei jungen WT-Mäusen mittels ICP-Massenspektrometrie nach Hochdruckveraschung ergab eine Konzentration von etwa 8 µg/g im Gehirn, und etwa 1,4 µg/g im Serum. Setzt man nun die Molare Masse von Eisen mit 55,85 g/mol ein, ergibt sich eine Gewebekonzentration von etwa 140 µM im Gehirn und 25 µM im Serum.

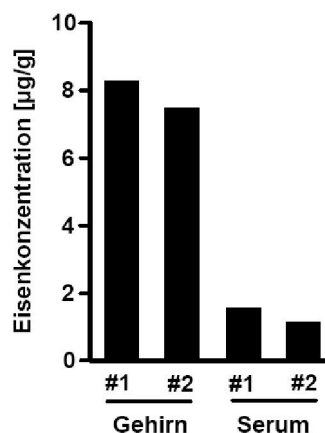


Abb. 3.19: Gewebespiegel von Fe^{3+} in Gehirn und Serum junger WT-Mäuse. Nach Hochdruckveraschung sind im blutleeren Hirngewebe Konzentrationen von etwa 8 µg/g und im Serum etwa 1,4 µg/g mittels ICP-Massenspektrometrie nachweisbar.

3.4.2 Pharmakologische Inhibition

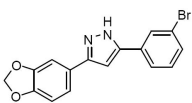
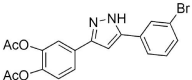
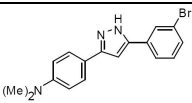
Um zu prüfen, ob sich die Inhibitoren der Proteinaggregation und Porenbildung *in vivo* überhaupt im Gewebe, v.a. im Gehirn anreichern, um dort Effekte erzielen zu können, wurden Pharmakokinetikversuche mit verschiedenen Derivaten von anle138b durchgeführt. Dazu wurden die Substanzen jeweils zwei jungen WT-Mäusen entweder mittels Schlundsonde, oder in Erdnussbutter vermengt oral verabreicht.

Da für die orale Gabe über Erdnussbutter lediglich die Gewebekonzentration zum Zeitpunkt 4 h bestimmt wurde, wurde auch für die anderen Substanzen v.a. dieser Wert für die Analyse herangezogen.

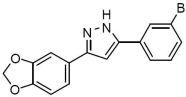
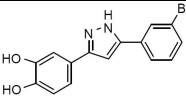
Die Konzentrationsbestimmung mittels HPLC-gekoppelter Massenspektrometrie zeigt, dass eine Verabreichung von 2,91 μmol anle138b mittels Schlundsonde in Konzentrationen $>10 \mu\text{M}$ im Gehirngewebe resultiert. Die Konzentration im Serum ist dabei um den Faktor 5-6 niedriger. Anle253b reichert sich nur in Konzentrationen $<10 \mu\text{M}$ im Gewebe an, während die Gabe von anle138d nicht zu nachweisbaren Gewebespiegeln führt.

Die orale Gabe von anle138b mittels Erdnussbutter resultiert auch bei geringen Konzentrationen in einer nachweisbaren Anreicherung im Gewebe, während anle138c nicht in nachweisbaren Mengen resorbiert wurde.

Tab.1.1: Gewebespiegel der 3,5-Diphenyl-Pyrazole in jungen WT-Mäusen 4 h nach Applikation via Gavage. Nach 4 h ist anle138b mit einer durchschnittlichen Konzentration von $>10 \mu\text{M}$ im Gehirn nachweisbar. Die Gehirnkonzentration liegt dabei um den Faktor 5-6 höher als die Serumkonzentration. Anle253b reichert sich nur in Konzentrationen $<10 \mu\text{M}$ im Gewebe an, wohingegen anle138d nicht zu nachweisbaren Gewebespiegeln führt (jeweils N=2 Tiere).

Substanz	Strukturformel	Menge [mg]	Lösungsmittel	Stoffmenge [μmol]	Gehirnspiegel [nmol/g]	Serumspiegel [nmol/g]
anle138b (MW: 343,17)		1,00	DMSO/Speiseöl (1:5)	2,91	17,88	2,89
					3,64	0,17
anle138d (MW: 415,24)		1,21	DMSO/Speiseöl (1:5)	2,91	0,00	0,00
					0,00	0,00
anle253b (MW: 342,23)		0,99	DMSO/Speiseöl (1:5)	2,91	10,83	1,60
					3,77	0,13

Tab.1.2: Gewebespiegel der 3,5-Diphenyl-Pyrazole in jungen WT-Mäusen 4h nach Applikation in Erdnussbutter. Über Applikation in 200 mg Erdnussbutter ist anle138b auch bei geringen Stoffmengen noch im Gehirn nachweisbar. Das Verhältnis der Konzentrationen Gehirn:Serum liegt wie bei der Applikation via Gavage im Bereich >5 (siehe Tab.1.1). Anle138c ist auch bei höheren Konzentrationen nicht in Gehirn oder Serum nachweisbar (jeweils N=2 Tiere).

Substanz	Strukturformel	Menge [mg]	Lösungsmittel	Stoffmenge [μmol]	Gehirnspiegel [nmol/g]	Serumspiegel [nmol/g]
anle138b (MW: 343,17)		0,20	DMSO	0,58	0,74	0,15
					2,25	0,24
anle138c (MW: 331,17)		1,00	DMSO	3,02	0,00	0,00
					0,00	0,00

4 Diskussion

Die pathologische Proteinaggregation zu amyloiden, β -Faltblattreichen Fibrillen und deren Ablagerung im Gehirn stellen offensichtlich molekulare Schlüsselereignisse in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen dar [2, 3]. Im Laufe der letzten Jahre häuften sich die Indizien, dass oligomere Intermediate der jeweils krankheits-spezifischen Proteine die toxische Aggregatspezies darstellen könnten, die letztlich zum Zelltod und den damit verbundenen motorischen und kognitiven Defiziten führen [1, 4, 5].

Zunächst konnten diese oligomeren, oder protofibrillären Intermediate strukturell für verschiedene krankheitsspezifische amyloidogene Proteine sowohl *in vitro*, als auch in Zellkultur und *in vivo* nachgewiesen werden. Darunter zählen das Prion-Protein der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit [116], polyglutaminhaltige Proteine, die beispielsweise mit dem Morbus Huntington assoziiert werden [163], das Amyloid β -Protein beim Morbus Alzheimer [112, 164] und auch α -Synuclein [83, 111, 119, 121, 165, 166]. Im Weiteren konnte für diese Proteine auch gezeigt werden, dass sie morphologisch ringförmige Strukturen, bzw. amyloide Poren bilden [109, 111-113, 116, 153], und dass diese amyloiden Poren funktionell in der Lage sind, die elektrophysiologischen Eigenschaften von Membranen zu modulieren [108, 110, 112, 117, 167].

Dadurch war wiederum die Annahme naheliegend, dass durch eine Poren-Aktivität der Protein-Oligomere die Toxizität dieser Aggregatspezies vermittelt werden könnte. Durch eine Schädigung der Zellmembran könnte z.B. durch einen unphysiologischen Ionenstrom entlang des Konzentrationsgradienten und den passiven Nachstrom von Wasser osmotischer Druck entstehen, durch den der nekrotische Zelltod verursacht werden kann [133, 134]. Durch Bildung einer Pore mit Kanal-Aktivität in der Mitochondrienmembran könnte wiederum z.B. ein offener „mitochondrial permeability transition pore“-Komplex simuliert werden, welcher an der Auslösung der Apoptose-Kaskade beteiligt ist [122].

Trotzdem gab es bis jetzt keine detaillierte Untersuchung des Effektes den α -Synuclein Oligomere auf Lipid-Membranen haben, um zu klären, ob dieser einen plausiblen Ansatz für den Mechanismus des Nervenzelltodes darstellen könnte. Wenn ja, könnte durch dessen Charakterisierung die toxische Aggregatspezies eine

messbare Eigenschaft erhalten, deren Modifizierung für die Entwicklung kausaler, krankheitsmodulierender Therapeutika herangezogen werden könnte.

4.1 Charakterisierung des Effektes von α -Synuclein Oligomeren auf Lipid-Doppelschichtmembranen

Um α -Synuclein Aggregate auf ihren potentiellen porenbildenden Effekt auf Lipid-Doppelschichtmembranen hin zu untersuchen, wurde die auf Einzelmolekülebene gut charakterisierte Partikelspezies der eiseninduzierten Oligomere verwendet. Diese wurden wie bereits beschrieben durch Inkubation des Monomers in Gegenwart von organischem Lösungsmittel und dreiwertigem Eisen generiert [59, 86, 90]. Dadurch sollten zum einen die hydrophobe Umgebung an Lipid-Membranen simuliert werden, und dem Umstand höherer Eisenkonzentrationen im Gehirn an PD erkrankter Patienten Rechnung getragen werden, um möglichst physiologische Aggregationsbedingungen zu schaffen.

Für diese eiseninduzierten Oligomere wurde gezeigt, dass sie ebenfalls ringförmige Strukturen bilden (siehe Abb. 1.3), ein verändertes Lipid-Bindungsverhalten aufweisen (siehe 1.3.3), Lipidvesikel permeabilisieren können und den Stromfluss über planare Lipid-Doppelschichtmembranen erhöhen können [59, 81, 86, 118]. In Primärkulturen corticaler Neurone steigern sie die prä- und postsynaptische Transmission und führen zu einer Calcium-Dyshomeostase und zum Zelltod [81, 89]. Obwohl die Daten der FCS-Experimente auf Einzelmolekülebene (siehe Abb. 3.7), nahe legen, dass durch die Inkubation mit DMSO und dreiwertigem Eisen die Bildung von Oligomeren getriggert wird, bleibt die Frage, ob es sich bei der im BLM-Assay verwendeten Partikelspezies tatsächlich um Oligomere handelt. Grund hierfür ist, dass sich die Rahmenbedingungen der Aggregation im BLM-Assay im Hinblick auf die verwendete α -Synuclein Konzentration, das Probenvolumen und die Inkubationszeit bei RT doch deutlich von den in den FCS-Experimenten vorherrschenden unterscheiden. Ein Hinweis darauf, dass es sich um Oligomere handelt, ist der Zeitverlauf der Detektionswahrscheinlichkeit von Membranschädigungen, der sich schon früh in den Experimenten gefunden hat. Während nicht-inkubiertes, monomeres α -Synuclein keinen Einfluss auf die elektrophysiologischen Membraneigenschaften hat, und auch bis zu 24 h Inkubation bei RT

daran messbar nichts ändern, steigt die Detektion von Porenbildungsereignissen nach 48 h bis auf ein Maximum nach 72 h an (siehe Abb. 3.9 A). Eine weitere Inkubation bis 96 h führt allerdings schon wieder zu einer deutlichen Abnahme der Detektionswahrscheinlichkeit. Das bedeutet, dass während der Inkubation eine Änderung am unwirksamen Monomer vorgeht, die es in die pathologische Form konvertiert, eine längere Inkubation lässt diese jedoch wieder weniger toxisch werden. Gestützt wird diese Vermutung durch frühere Studien, in denen ein vergleichbarer Einfluss eiseninduzierter Aggregate auf Lipid-Membranen spezifisch durch den oligomerspezifischen Antikörper A11 geblockt werden konnte [4, 86], sowie in eigenen Versuchen durch Baicalein, einen gut charakterisierten Inhibitor der Proteinaggregation (siehe Abb. 3.7 und 3.18) [59, 86].

Nachdem in FCS-Experimenten auf Einzelmolekülebene nachgewiesen wurde, dass die Inkubation des Monomers mit DMSO und Eisen reproduzierbar zur Bildung von Oligomeren führt, und diese „on pathway“ zu amyloiden Fibrillen sind [86], liegt die Vermutung nahe, dass innerhalb der ersten 48 h das toxische Oligomer gebildet wird, das nach 72 h ein Konzentrationsmaximum erreicht und dann weiter zu zwar unphysiologischen, aber nicht mehr toxischen Fibrillen aggregiert. Dadurch sinken die effektive Konzentration des toxischen Oligomers und die Detektionswahrscheinlichkeit nach 96 h.

Bleibt die Frage zu klären, wie genau die Interaktion der toxischen Oligomere mit den Membranen deren Leitwert erhöht. Dazu wurden die Membranschädigungen nach ihrer Detektion elektrophysiologisch auf Einzelkanalebene charakterisiert.

Theoretisch wären verschiedene Modelle denkbar, über die die Bindung von α -Synuclein Oligomeren an Lipid-Membranen den Stromfluss über diese erhöhen könnte (siehe Abb. 4.1). Zum einen könnte die Bindung zu einer diffusen Schädigung der Membranstruktur führen, durch die der Stromfluss mehr oder weniger unspezifisch erhöht werden würde. Ein Beispiel hierfür wäre z.B. ein Ausdünnen der Membran (Modell A, Abb. 4.1 A), was im Weiteren zu deren Bruch führen könnte [123].

Eines der ersten und über alle Versuche konsistenten Ergebnisse der elektrophysiologischen Charakterisierung der durch α -Synuclein Oligomere hervorgerufenen Membranschädigungen waren diskrete Änderungen im Leitwert über die Membran. Häufigkeit und Wert der als *Steps* bezeichneten stufenweisen Änderungen hingen von der Polarität und Amplitude der an die Membran angelegten Spannung

ab (siehe Abb. 3.10-3.12). Darüber hinaus wiesen die Verteilungen der gemessenen *Steps* im Leitwert, sowie die eingenommenen Absolutwerte des Leitwertes der Membran diskrete *Peaks* auf, und zwar jeweils bei einer von der Spannung abhängigen Quantumeinheit und Vielfachen von dieser (siehe Abb. 3.13-3.15).

Dieses diskrete und im Hinblick auf die angelegte Spannung asymmetrische Verhalten macht eine diffuse und unspezifische Schädigung der Membran durch Bindung der α -Synuclein Oligomere unwahrscheinlich. Hier hätte man ähnlich wie bei einer unspezifischen Schädigung der Membran durch hohe Spannungen eine kontinuierliche Verteilung der eingenommenen Leitwerte angenommen und kein diskretes Hin- und Herschalten zwischen verschiedenen Zuständen [168].

Eine diskrete Schädigung der Membran wiederum, die in definierten Leitwertzuständen resultiert, wäre aber durch die Bildung distinkter transmembraner Poren denkbar. Schaltereignisse, durch die zwischen verschiedenen dieser Leitwertzustände hin- und hergewechselt werden kann, wären dabei wiederum durch verschiedene Modelle erklärbar. Zum einen könnte eine sprunghafte Konformationsänderung der inserierten Pore zwischen verschiedenen Zuständen in verschiedenen definierten Leitwertzuständen resultieren (Modell B, Abb. 4.1 B). Zum anderen könnten die diskreten *Steps* durch eine Fluktuation in der Anzahl ionendurchlässiger Poren zustande kommen. Diese Fluktuationen könnten entweder durch eine spontane Insertion von Poren in und deren De-Insertion aus der Membran (Modell C, Abb. 4.1 C) bedingt werden, oder durch Öffnungs- oder Schließereignisse stabil in die Membran inserierter Poren (Modell D, Abb. 4.1D).

Bei den Versuchen zur Kationenabhängigkeit des Leitwertes der Membranschädigungen zeigte sich, dass nach einem vollständigen Austausch des Kammerpuffers nach Porendetektion und -charakterisierung der Leitwert über die Membran immer noch erhöht war, und dass *Steps* in beide Richtungen mit quasi der gleichen Häufigkeit und Verteilung gemessen wurden, wie vor dem Austausch (siehe Abb. 3.16 und 3.17). Das spricht gegen das Modell C, da mit dem Austausch des Puffers sämtliche noch frei im Kammerpuffer verfügbaren α -Synuclein Oligomere entfernt worden sein sollten, die in die Membran (re-)inserieren könnten. Eine stabile Insertion distinkter Poren ist demnach wesentlich naheliegender, als eine reversible Insertion und De-Insertion.

Die spannungsabhängigen *Steps* im Leitwert sollten sich also durch sprunghafte Konformationsänderungen der inserierten Poren, die eine Zu- oder Abnahme des

Ionenflusses bedingen, oder durch Öffnungs- und Schließereignisse gleichförmiger Poren erklären lassen. Diese Hypothese wird durch die nähere Analyse der Größe der Schaltereignisse gestützt. Abhängig von der angelegten Spannung wurde hier eine symmetrische Verteilung um 0 pS gefunden (siehe Abb. 3.13), das bedeutet, dass es *Steps* des gleichen Betrages in beide Richtungen gab, die Poren also zwischen zwei Zuständen, „hoch-“ und „niederleitend“ oder „offen“ und „zu“ hin- und herschalten.

Die detaillierte Untersuchung des Gesamtdatensatzes bei +80 mV angelegter Spannung zeigt, dass die Verteilung der gemessenen absoluten Leitwerte definierte *Peaks* aufweist, die sich jeweils um eine definierte *Step*-Größe von ~100 pS oder, wesentlich seltener Vielfachen davon unterscheiden. Es fällt auch auf, dass höhere Leitwertzustände wesentlich seltener gemessen wurden, als niedrigere (siehe Abb. 3.14). Wären die eingenommenen Leitwerte durch verschiedene Konformationszustände einer Pore (Modell C) begründet, die sich jeweils um die gemessene *Step*-Größe von einander unterscheiden, sollten sie spannungsabhängig eigentlich in allen Experimenten gleich häufig messbar sein. Tatsächlich zeigt sich ein abweichendes Bild auch in der Auswertung repräsentativer Einzelexperimente (siehe Abb. 3.15). Bei gleicher *Step*-Größe von ~100 pS werden unterschiedliche Leitwertzustände gemessen: während im Experiment A nur zwischen zwei Zuständen gewechselt wird, sind es im Experiment B drei und im Experiment C sogar vier. Warum sollten also bestimmte Leitwerte, bestimmte Konformationen unterschiedlich häufig eingenommen werden?

Die Daten sind wesentlich leichter durch ein Modell zu erklären, das auf der stabilen Insertion gleichförmiger Poren beruht, die sich im Wesentlichen unabhängig voneinander öffnen und schließen (Modell D). Damit würden sich für die Einzelexperimente Situationen mit einer oder mehreren in die Membran inserierten Poren ergeben, die sich im Zustand „offen“ oder „geschlossen“ befinden können.

Im Experiment A hätte sich demnach eine Pore in die Membran inseriert, die sich entweder im geschlossenen oder im offenen Zustand befindet, also in einem nieder- oder hochleitenden Zustand, was in den gemessenen Leitwertleveln von 14 bzw. 119 pS resultiert (siehe Abb. 3.15 A). Der Übergang von dem einen in den anderen Zustand resultiert in der gemessenen *Step*-Größe von $\pm \sim 100$ pS. Entsprechend wären im Experiment B zwei Poren in die Membran inseriert, die in den Zuständen „beide geschlossen“ (18 pS), „eine offen, eine geschlossen“ (119 pS) und „beide

offen“ (224 pS) vorliegen können. Trotzdem ist wiederum nur die *Step*-Größe von $\pm \sim 100$ pS messbar (siehe Abb. 3.15 B). Das lässt den Schluss zu, dass die Poren in diesem Experiment unabhängig voneinander zwischen den Zuständen „offen“ und „geschlossen“ wechseln. Im Experiment C scheint sehr selten auch das simultane Öffnen oder Schließen zweier Poren aufzutreten, da bei einer Insertion von drei Poren mit den möglichen Zuständen „alle geschlossen“ (40 pS) und „eine, zwei, oder drei Poren offen“, (142, 247, oder 342 pS) zwar wieder *Steps* von $\pm \sim 100$ pS, aber, wenn auch wesentlich seltener auch $\pm \sim 200$ pS gemessen werden. Hier schalten also in seltenen Fällen auch zwei Poren gleichzeitig zwischen den jeweils möglichen Zuständen „offen“ und „geschlossen“ hin und her (siehe Abb. 3.15 C).

Zusätzlich fällt bei der Betrachtung der Einzelexperimente auf, dass die gemessenen Leitwertlevel nicht den gemessenen *Step*-Größen entsprechen. Im Experiment A werden *Steps* von $\pm \sim 100$ pS gemessen, der Leitwert der offenen Pore ist jedoch mit 119 pS deutlich höher. Darüber hinaus ist der Leitwert einer geschlossenen Pore auch nicht 0 pS, sondern in diesem Fall 14 pS (siehe Abb. 3.15 A).

Dieses Phänomen ist konsistent in allen analysierten Einzelexperimenten zu finden (vgl. auch Abb. 3.14 A, die die Leitwerte aller Einzelexperimente zeigt), und am einfachsten durch ein Modell erklärbar, in dem auch im niederleitenden Zustand, in dem die Pore „geschlossen“ ist, ein geringer Leckstrom messbar ist. Dieser müsste dann größer werden, je mehr geschlossene Poren inseriert sind, und tatsächlich liegt im Experiment C ein niederleitender Zustand von 40 pS vor, im Vergleich zu 14 pS im Experiment A (siehe Abb. 3.15 A und C). Damit würde sich aus den dargestellten Experimenten also ein mittlerer Leitwert von ~ 12 pS pro stabil inserierter, geschlossener α -Synuclein Pore ergeben.

Zusammengefasst legen die Daten also ein Modell nahe, in dem distinkte, gleichförmige Poren als Komplexe durch ein definiertes Zusammenlagern von α -Synuclein-Molekülen gebildet werden und so einen diskreten Effekt auf den Stromfluss über Lipid-Doppelschichtmembranen haben.

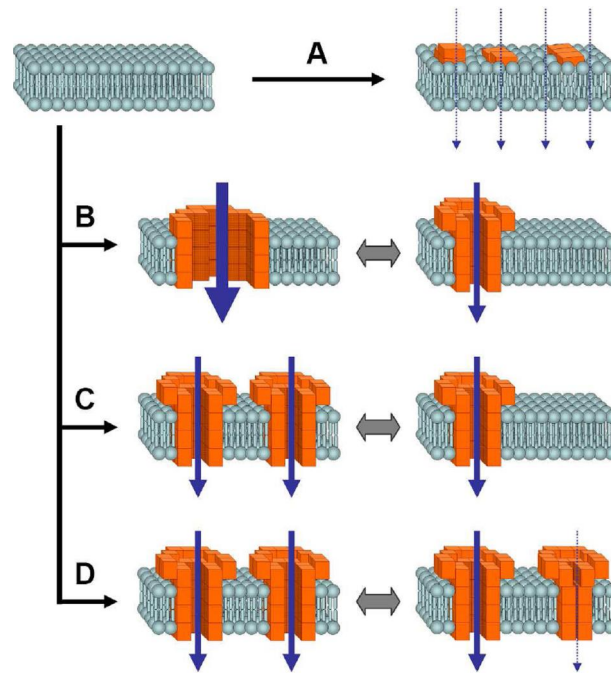


Abb. 4.1: Schematische Darstellung unterschiedlicher Modelle erhöhten Membran-Leitwertes durch Bindung von α -Synuclein Oligomeren. **A** Die Bindung der Oligomere an die Membran könnte zu einer diffusen Schädigung führen, durch die der Stromfluss über die Membran unspezifisch erhöht wird. **B** Durch die Bildung distinkter Poren, könnte der Stromfluss spezifisch erhöht werden. Spontane, spannungsabhängige Konformationsänderungen könnten zu den gemessenen *Steps* im Leitwert führen. **C** Durch Insertion gleichartiger Poren in und deren De-Insertion aus der Membran könnte der Leitwert in Vielfachen einer Quantumeinheit erhöht werden. **D** Gleichartige Poren könnten auch stabil in die Membran inserieren und Öffnungs- oder Schließereignisse der inserierten Poren zu den gemessenen Leitwert-*Steps* führen.

4.2 Oligomere Porenbildung als möglicher Pathomechanismus des Nervenzelltodes

Nachdem die durch Bindung von α -Synuclein Oligomeren vermittelte Schädigung von Lipid-Doppelschichtmembranen möglicherweise auf der Bildung distinkter transmembraner Poren beruht, ist bei der Frage nach der möglichen Toxizität ein Vergleich mit porenbildenden Bakterientoxinen naheliegend. Diese stellen ein von der Evolution optimiertes System zur Vermittlung zelltoxischer Effekte dar. Wie schon unter 1.5.3 beschrieben vermitteln z.B. Gramicidin aus *Bacillus brevis* oder α -Hemolysin aus *Staphylococcus aureus* ihre toxische Wirkung durch Bildung oligomerer Poren in Lipid-Doppelschichtmembranen: im Falle von Gramicidin bilden zwei lipophile Monomere durch Dimerisierung einen helicalen Ionenkanal in der Membran. α -Hemolysin bildet durch Oligomerisierung der wasserlöslichen Monomere an der Membranoberfläche homoheptamere Poren in Lipid-Doppelschicht-

membranen. Während für Gramicidine ein Einzelkanal-Leitwert von ~5-20 pS unter vergleichbaren Bedingungen beschrieben wurde, lag dieser für α -Hemolysin bereits bei 240 pS [133, 154, 169]. Der durch die *Step*-Größe suggerierte Leitwert einer einzelnen α -Synuclein-Pore von ~100 pS liegt also prinzipiell in einem Bereich, in dem zytotoxische Effekte vermittelt werden könnten.

Ein Vergleich mit bakteriellen Porinen zeigt zudem noch weitere Parallelen auf. So wurden für verschiedene Porine Gram-negativer Bakterien ebenfalls *Steps* im Leitwert beschrieben. Diese wurden, ähnlich des Verhaltens spannungsabhängiger Ionenkanäle, als spannungsabhängige Öffnungs- und Schließereignisse von Einzelkanälen interpretiert, die Größe der Änderung demnach als der Leitwert eines Einzelkanals. Ein Beispiel hierfür ist das Matrix Protein PG1 von *E. Coli*, das stabile Kanäle in Lipid-Membranen bildet, die auch miteinander schalten können, wodurch *Steps* im Leitwert um ein Vielfaches der Quantumeinheit (~500 pS) messbar werden [170-175]. Auch „outer membrane protein (Omp) 34“, ein Porin aus *Acidovorax delafieldii* zeigt Schließereignisse von inserierten Einzelkanälen in Abhängigkeit von der angelegten Spannung. Darüber hinaus ist auch der Leitwert des Einzelkanals (~450 pS) abhängig von der angelegten Spannung, er ist für positive Spannungen höher als für negative. Im Fall von Omp34 wird dies durch eine unidirektionale Einlagerung in die Lipid-Membran erklärt, die zu diesem asymmetrischen Verhalten führt [176].

Im Falle von α -Hemolysin wurde ebenfalls eine Abhängigkeit des Leitwertes des Einzelkanals vom verfügbaren Kation nachgewiesen. Für Na^+ -Ionen war der Leitwert der Pore etwa 25 % geringer als für K^+ -Ionen der gleichen Molarität [177].

Interessanterweise zeigt auch der mit der Apoptose assoziierte „mitochondrial permeability transition pore“-Komplex einen vom Membranpotetial abhängiges kanalähnliches Verhalten ähnlich dem der beschriebenen Porine mit stufenweisen Übergängen zwischen Leitwertzuständen von 30 pS bis 1,3 nS (150 mM KCl) [122, 178].

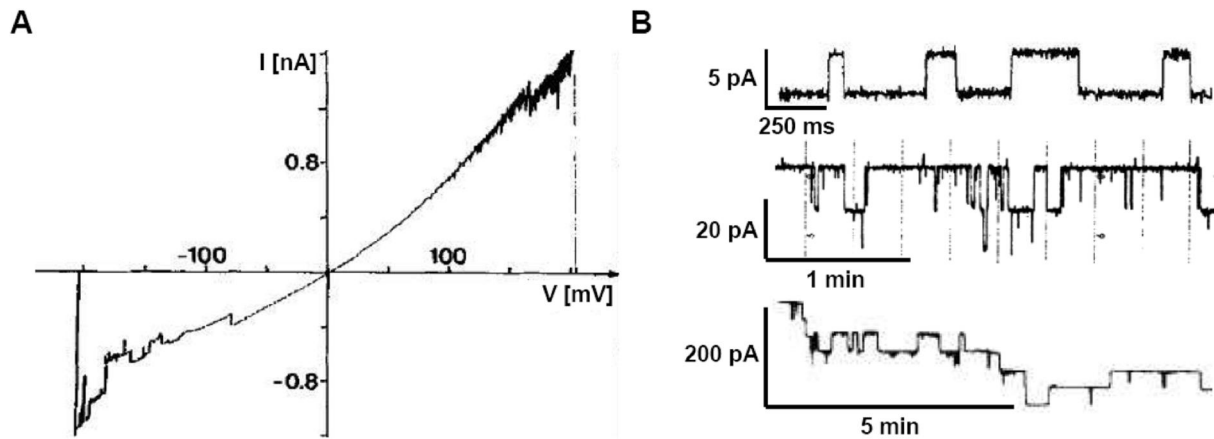


Abb. 4.2: Spannungs-Stromkurven von Membranen mit verschiedenen inserierten Porinen.

A Stromfluss über eine Membran mit inserierten Omp34-Poren bei angelegter Spannungsrampe. Bei hohen positiven und negativen Spannungen sind Schaltereignisse sichtbar und für positive Spannungen ist der abfallende Strom höher als für negative [176]. **B** Der Stromfluss über Membranen mit verschiedenen inserierten Poren bakterieller Toxine zeigt deutliche Schaltereignisse bei angelegten Rechteckspannungen. Über die Zeit zeigen Gramicidin-Poren (oben) Schaltereignisse zwischen zwei Zuständen, „offen“ und „geschlossen“. Der Leitwert eines einzelnen offenen Kanals beträgt dabei ~ 20 pS (3,5 pA bei 180 mV und 100 mM KCl) [169]. Auch α -Hemolysin-Poren (mitte) zeigen ein Schaltverhalten bei konstanten Spannungen von ~ 180 pS pro Einzelkanal (18 pA bei 100 mV und 150 mM KCl) [177], Poren des Matrix-Proteins PG1 (unten) einen Leitwert von ~ 140 pS pro Einzelkanal (33,5 pA bei 240 mV in 100 mM NaCl) [170].

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich von eiseninduzierten α -Synuclein Oligomeren gebildete Poren einige elektrophysiologische Eigenschaften mit bakteriellen Porinen teilen, so z.B. die Abhängigkeit des Leitwertes von Einzelkanälen von der angelegten Spannung und dem verfügbaren Kation (siehe Abb. 3.13 und 3.17) und das spannungsabhängige Öffnen und Schließen der Einzelkanäle (siehe Abb. 3.12). Das asymmetrische Verhalten bezüglich Polarität und Amplitude der angelegten Spannung könnte sich in einer unidirektionalen Insertion von asymmetrischen Poren in die Lipid-Membran begründen. Dieser Umstand könnte seinen Ursprung wiederum in der Tatsache haben, dass die α -Synuclein Oligomere immer auf Seiten der *cis*-Kammer appliziert wurden, wodurch die einseitige, asymmetrische Einlagerung vermutlich forciert wurde.

Der Leitwert des Einzelkanals liegt in der gleichen Größenordnung wie die Leitwerte der durch bakterielle Toxine gebildeten Poren und könnte somit ausreichend sein, zelltoxische Effekte zu vermitteln. Der Leitwert ist deutlich niedriger, als der durch Omps von *E. coli* vermittelten Poren, die unter vergleichbaren Bedingungen im Bereich von 375-525 pS liegen [171]. Eine Porenbildung durch Kontaminationen mit Omps bei der Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus *E. coli* ist damit also unwahrscheinlich. Gestützt wird dies auch durch den Zeitverlauf der Porendetektion

(siehe Abb. 3.9 A): eine Porenbildung durch Omp-Kontaminationen sollte schon beim nicht-inkubierten Protein nachweisbar sein, und sich nicht über die Zeit veränderlich verhalten.

Damit ist die Annahme einer pathologischen Porenbildung durch α -Synuclein Oligomere als Mechanismus des Nervenzelltodes in der Pathogenese von Synucleinopathien naheliegend.

4.3 Biologische Relevanz

Es ist wie unter 4.2 diskutiert naheliegend, dass *in vitro* erzeugte α -Synuclein Oligomere diskrete Poren in Lipid-Membranen bilden können. Diese Porenbildung kann durch Inhibitoren der Aggregation auch verhindert, also grundsätzlich moduliert werden. Es bleibt jedoch die Frage, ob durch die hier gewonnenen Erkenntnisse ein plausibles Modell des Nervenzelltodes *in vivo* geliefert wird.

Ein Hinweis ist die unter 4.2 beschriebene Ähnlichkeit der Membranschädigung mit der durch bakterielle Toxine vermittelten auf elektrophysiologischer Ebene. Da diese eine zelltoxische Wirkung *in vivo* besitzen und sich elektrophysiologisch *in vitro* sehr ähnlich verhalten, liegt die Vermutung nahe, dass der Effekt der α -Synuclein Oligomere auf Lipid-Membranen ausreichend sein könnte, um toxische Effekte auszulösen. Trotzdem bleibt die Frage, in wie weit dieses Modell physiologische Bedingungen widerspiegelt.

4.3.1 Aggregationsbedingungen

Auf Einzelmolekülebene konnten wir bereits in früheren Studien zeigen, dass sich durch Inkubation des physiologischen Monomers mit Eisen kleine SDS-resistente Oligomere bilden, die nicht fibrillär sind, ringförmige Strukturen bilden und die elektrophysiologischen Membraneigenschaften, sowie die Calcium-Homöostase und die Reizweiterleitung in Zellkultur beeinflussen können [59, 81, 86, 89, 118]. Diese haben also einige strukturelle und morphologische Gemeinsamkeiten mit den aus dem Gewebe von an PD und MSA leidenden Patienten aufgereinigten α -Synuclein Aggregaten [119-121] und deuten mögliche zelltoxische Eigenschaften an.

Die Charakterisierung der durch α -Synuclein induzierten Poren wurde in dieser Arbeit jedoch für Oligomere vorgenommen, die durch Inkubation von 7 μ M Monomer in

Gegenwart von 20 μM Eisen induziert wurden (siehe 2.4.2 und Abb. 3.9 B), also z.T. wesentlich höheren Protein-Konzentrationen. Die Frage ist also, ob sich diese Oligomere unter annähernd physiologischen Bedingungen bilden.

Die durchschnittliche Konzentration an α -Synuclein wird in Studien an *post mortem* gewonnenem Gewebe aus Gehirnen von an PD erkrankten Patienten mit $0,74 \pm 0,19$ ng/ μg (Mittelwert \pm SEM) für die Substantia nigra angegeben, bei Individualwerten von 0,1-1,86 ng/ μg in 9 Fällen. Im gesunden Kontrollgewebe wurde im Durchschnitt eine Konzentration von $0,26 \pm 0,08$ ng/ μg gefunden bei Individualwerten von 0,03-0,87 ng/ μg in 10 Fällen [179]. Legt man das Molekulargewicht α -Synucleins von etwa 14400 g/mol zugrunde, entspricht eine Konzentration von 7 μM einem Gewebespiegel von etwa 0,1 ng/ μg . Die verwendeten Konzentrationen von 0,7, 2,1 und 7,0 μM (siehe Abb. 3.9 B) liegen also durchaus im physiologisch nachweisbaren Spektrum, und innerhalb dessen sogar an der unteren Grenze des pathologisch interessanten Bereiches.

Für die Eisenkonzentrationen im menschlichen Gehirn werden Werte von 200 ng/mg für gesunde Erwachsene angegeben, diese können im Laufe der PD-Erkrankung um bis zu 35 % ansteigen [95], was einer Konzentration von $\sim 3,6$ -3,9 mM entsprechen würde. Eine Idee war, die Pathogenese in Mäusen, die transgen für humanes α -Synuclein mit der A30P-Mutation unter dem neuronalen Thy1-Promoter sind [180-182] durch Fütterung mit definierten Konzentrationen an dreiwertigen Metallionen zu beschleunigen. Dazu wurden zunächst blutleeres Hirngewebe und Serumproben von C57/BL6 WT-Tieren, dem genetischen Hintergrund der A30P-transgenen Tiere mittels Hochdruckveraschung und Massenspektrometrie bei normaler Fütterung bestimmt. Hier ergaben sich Konzentrationen von ~ 140 μM im blutleeren Gehirn und ~ 25 μM im Serum (siehe Abb. 3.19). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Eisenkonzentration von 20 μM liegt also am unteren Ende des physiologisch nachweisbaren Spektrums, wobei natürlich zu beachten ist, dass im Gewebe der größte Anteil von Eisen in gebundener Form vorliegt.

Das bedeutet, dass sowohl die Protein-, als auch die Eisenkonzentration, die hier verwendet wurden, im Rahmen dessen liegen, was physiologisch nachweisbar ist. Dementsprechend könnten theoretisch die von uns verwendeten porenbildenden Oligomere und die charakterisierte Porenspezies auch *in vivo* entstehen und die Bildung oligomerer Poren in Lipid-Membranen somit einen möglichen Pathomechanismus darstellen.

Die Idee der Beschleunigung der Pathogenese durch die diätische Fütterung von Thy1-A30P-Mäusen mit dreiwertigen Metallionen und die Korrelation der Gewebespiegel mit immunhistochemisch und proteinbiochemisch nachweisbaren Aggregaten im Gehirn, sowie dem Auftreten und der Schwere motorischer Defizite im Krankheitsverlauf wurde im Rahmen der medizinischen Doktorarbeit von Fr. Karin Schinke unter meiner Mitbetreuung weiterverfolgt.

4.3.2 Pharmakologische Inhibition

Sowohl durch oligomerspezifische Antikörper wie A11 und synucleinspezifische Antikörper als auch durch gut charakterisierte Aggregationsinhibitoren wie Baicalein lässt sich nicht nur die Oligomerbildung, sondern auch die Porenbildung inhibieren [59, 86]. Darüber hinaus konnte anle138b, ein neuartiger Aggregationsinhibitor, nicht nur die Aggregation von Prion-Proteinen [151, 152], sondern auch von α -Synuclein auf Einzelmolekülebene signifikant in einer klaren Dosis-Wirkungsbeziehung verringern (siehe Abb. 3.7). Die Substanz wies darüber hinaus eine gute orale Bioverfügbarkeit auf und erreichte dadurch gute Gewebespiegel im Gehirn [152]. Deshalb wurde die Wirkung auf das Überleben zunächst von mittels intracranialer Inokulierung mit Prion-Protein infizierter Mäuse getestet, da dieses Modell gut etabliert und sehr reproduzierbar war. Durch Gabe der Substanz konnte das Überleben der Mäuse signifikant verlängert werden [152]. Darauf aufbauend wurde im Rahmen der von mir mitbetreuten medizinischen Doktorarbeit von Fr. Catharina Prix geprüft, ob sich die Substanz positiv auf das Überleben und den motorischen Phänotyp von Thy1-A30P-Mäusen auswirkt [180, 181]. Dabei wurde gefunden, dass die Mäuse nicht nur deutlich weniger pathologische Ablagerungen im Gehirn aufwiesen, sondern auch einen stabileren motorischen Phänotyp und ein signifikant verlängertes krankheitsfreies Überleben zeigten. Dazu wurde das RotaRod verwendet, eine gut etablierte Methode, um motorische Defizite, u.a. im verwendeten, aber auch in anderen Mausmodellen mit einem neurologischen Phänotyp, der zu motorischen Defiziten führt, quantitativ zu beschreiben [152, 182, 183].

Das könnte auf einen gemeinsamen Pathomechanismus neurodegenerativer Erkrankungen hinweisen, der sich deshalb durch dieselbe Substanz blocken lässt. Dass anle138b die Porenbildung signifikant inhibiert und dabei auch auf Einzelmolekülebene und in *in vivo*-Modellen der neurodegenerativen Krankheiten wirksam

ist, könnte dann wiederum darauf hinweisen, dass eine pathologische Porenbildung diesen gemeinsamen Mechanismus darstellen könnte.

Im Rahmen der medizinischen Doktorarbeit von Fr. Cathrin Böhm wurde unter meiner Mitbetreuung der Effekt unterschiedlicher Derivate von anle138b auf das krankheitsfreie Überleben der transgenen Tiere und die Ablagerung pathologischer Aggregate im Gehirn untersucht. Zum Vergleich wurde nicht nur anle138b verabreicht, sondern auch in einem „late-therapy“-Versuch der Effekt auf die o.g. Parameter in einem Modell untersucht, in dem die Substanz erst zu einem Zeitpunkt verabreicht wird, wenn bereits pathologische Aggregate im Gehirn nachweisbar sind. Dadurch sollte ein realistischeres Bild der Substanzwirkung *in vivo* für eine mögliche Therapie beim Menschen gewonnen werden. Die Behandlung mit kausalen Therapieansätzen zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung, wenn die Motorik zwar noch unauffällig ist, die ersten peripheren Auswirkungen der Erkrankung aber möglicherweise schon diagnostizierbar sind, sollte einen großen medizinischen Nutzen haben. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass auch eine späte Therapie mit anle138b in einem signifikant verlängerten krankheitsfreien Überleben transgener Tiere resultiert [184].

Es ist ein gemeinsames Merkmal aller bisher verfügbaren Behandlungsstrategien, dass sie lediglich symptomatische, aber keine kausalen, krankheitsmodulierenden Therapien darstellen. Ein besseres Verständnis der krankheitsauslösenden Prozesse auf molekularer Ebene und die Entdeckung einer distinkten Partikelspezies mit potentiell toxischen Eigenschaften als mögliche Zielstruktur könnten die Entwicklung dieser kausalen Therapieansätze in der Zukunft ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Neben dem progressiven Verlust von Nervenzellen sind alle häufigen neurodegenerativen Erkrankungen durch die Bildung und Ablagerung krankheits-spezifischer Proteinaggregate gekennzeichnet. Im Fall des PD bilden sich diese Ablagerungen in Form von zytoplasmatischen Lewy-Körperchen und -Neuriten, die im Wesentlichen aus aggregiertem α -Synuclein bestehen. Der Mechanismus, über den α -Synuclein, das auch im gesunden Gehirn in einer physiologischen Form vorkommt, seine Toxizität vermittelt, ist bis heute ungeklärt.

Für die Entstehung einer neurotoxischen Aggregatspezies scheinen dreiwertige Metallionen eine entscheidende Rolle zu spielen. *In vitro* begünstigen dreiwertige Eisenionen die Bildung einer distinkten Aggregatspezies, die die prä- und post-synaptische Transmission in Primärkulturen corticaler Neurone steigern, zu Calcium-Dyshomeostase und zum Zelltod führen. Auch durch Zugabe von Fe^{3+} ins Zellkultur-medium konnte die Oligomerisierung von intrazellulärem α -Synuclein gefördert und die Zelltoxizität gesteigert werden. Der Einfluss von Eisen auf die Entstehung pathologischer Proteinaggregate *in vitro* und in Zellkultur ist insofern bemerkenswert, als dass Eisen eine entscheidende Rolle in der Entstehung des PD zu spielen scheint.

Um zu klären, welcher Art die Schädigung der Zellen ist, die aus der Bindung pathologischer Aggregate resultiert, wurde zunächst durch Einzelmolekülspektroskopische Experimente an rekombinant hergestelltem Protein bestätigt, dass durch organische Lösungsmittel und Eisen die Proteinaggregation forciert werden kann. Darüber hinaus konnte ich zeigen, dass verschiedene Aggregationsinhibitoren, wie auch die neuartige Substanz anle138b die Entstehung der Oligomere z.T. vollständig blocken konnten. Im Hauptteil der Arbeit wurde in einem Messaufbau, der zur Untersuchung der Elektrophysiologie auf Einzelkanalebene geeignet war, der Einfluss eiseninduzierter Oligomere auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von Lipid-Doppelschichtmembranen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass α -Synuclein Oligomere in Abhängigkeit von Proteinkonzentration und Inkubationszeit in der Lage sind, distinkte Poren in Lipid-Membranen zu bilden. Diese scheinen stabil in die Membran zu inserieren und zeigen dabei offenbar Öffnungs- und Schließereignisse. Dieses Verhalten ist im Bezug auf das vorherrschende Membranpotential

asymmetrisch, da es bei hohen positiven Spannungen häufiger auftritt, als bei negativen. Auch die Größe der Leitwärtsänderung, die mit Öffnen und Schließen der Poren einhergeht, ist spannungsabhängig, für einzeln angelegte Spannungen aber konstant (z.B. $\pm \sim 100$ pS bei +80 mV). Dies deutet auf die Bildung distinkter Poren durch α -Synuclein Oligomere hin, die ein einheitliches und charakteristisches elektrophysiologisches Verhalten zeigen.

Dieses zeigt einige Parallelen mit dem „mitochondrial permeability transition pore“-Komplex, der in der Apoptose-Kaskade der Zelle involviert ist, sowie mit dem Verhalten von porenbildenden Bakterientoxinen, die ein von der Evolution optimiertes System zur Vermittlung zelltoxischer Effekte darstellen. Dazu gehören zum einen die Spannungsabhängigkeit von Öffnungs- und Schließereignissen inserierter Kanäle, als auch die Abhängigkeit des Leitwertes des Einzelkanals vom verfügbaren Kation. Der Leitwert der α -Synuclein Poren bewegt sich ebenfalls in der gleichen Größenordnung, wie der bakterieller Porine.

Die verwendete Konzentration von α -Synuclein liegt dabei im Bereich dessen, was in pathologischem Hirngewebe nachweisbar ist, und ich konnte zeigen, dass auch die verwendete Eisenkonzentration im Bereich dessen liegt, was man nach Perfusion, Hochdruckveraschung und anschließender Massenspektrometrie im Gewebe von Mäusen nachweisen kann. Die hier charakterisierte Partikelspezies könnte also auch *in vivo* entstehen und dort durch Bildung ionendurchlässiger Poren zelltoxische Effekte zu vermitteln.

Interessanterweise ließ sich die Porenbildung signifikant durch die von mir pharmakokinetisch charakterisierte Substanz anle138b hemmen, einen neuartigen Aggregationsinhibitor, der nicht nur die Aggregation verschiedener krankheitsspezifischer Proteine *in vitro* hemmt, sondern auch in mehreren Tiermodellen verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen wirksam war. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass die Porenbildung durch pathologische, krankheitsspezifische Oligomere einen gemeinsamen Mechanismus der Neurodegeneration darstellen könnte.

Durch die detaillierte elektrophysiologische Charakterisierung der pathologischen Poren konnte in der vorliegenden Arbeit somit erstmals detailliert eine neue Zielstruktur beschrieben werden, die zur Entwicklung kausaler, krankheitsmodulierender Therapeutika herangezogen werden könnte.

Summary

In addition to progressive loss of neurons, all common neurodegenerative disorders are characterized by the formation and deposition of disease-specific protein aggregates. In Parkinson's disease, these deposits are formed as cytoplasmic Lewy bodies and Lewy neurites which mainly consist of aggregated α -synuclein. The mechanism by which α -synuclein, which is also present in the normal brain in a physiological form, mediates its toxicity is still unknown.

Trivalent metal ions seem to play a crucial role in the formation of neurotoxic protein aggregates. *In vitro* trivalent iron promotes the formation of a distinct aggregate species that increases pre- and post-synaptic transmission in primary cultures of cortical neurons, leads to calcium dyshomeostasis and cell death. Furthermore, the addition of Fe^{3+} to cell culture medium promotes the oligomerization of intracellular α -synuclein and increases cytotoxicity. The influence of iron on the formation of pathological protein aggregates *in vitro* and in cell culture is remarkable, as iron seems to play a crucial role in the development of PD.

In order to investigate the nature of cell damage mediated by pathological aggregates, I first performed confocal single-molecule spectroscopy experiments using recombinant protein. In these experiments, I confirmed that the protein aggregation can be accelerated by co-incubation with organic solvents and iron. In addition, I showed that different aggregation inhibitors like the novel compound anle138b can block the formation of oligomers. In the main part of this study, the effect of iron-induced oligomers on the electrophysiological properties of lipid bilayers was investigated using a set up for single-channel electrophysiology. It could be shown that α -synuclein oligomers are able to form distinct pores, depending on protein concentration and incubation time. These pores inserted stably into the membrane and show opening and closing events. This behavior was asymmetrical depending on the membrane potential, as more events were recorded for high positive voltages than for negative. The size of the changes in bilayer conductance by opening and closing of pores depends on the clamped voltage, but is constant for individual voltages (e.g. $\pm \sim 100$ pS at +80 mV). This points to the formation of distinct pores by α -synuclein oligomers, which show a consistent and characteristic electrophysiological behavior.

Interestingly, synuclein pores exhibited some similarities with the mitochondrial permeability transition pore-complex, which is involved in the apoptotic cascade, as well as with the behavior of pore-forming bacterial toxins, which are optimized by evolution for mediation of cytotoxic effects. These similarities include the voltage dependence of open and closure events of inserted channels, as well as the dependence of the conductance of the single-channel on the available cation. The conductance of α -synuclein pores was found to be in the same order of magnitude as the conductance of bacterial porins.

The concentration of α -synuclein used for the generation of oligomer pores is in the range of what is detectable in pathological brain tissue. Moreover, I could show that the iron concentration used is in the range of what is detected in mouse tissue after perfusion, high pressure ashing and subsequent mass spectrometry. Hence, the particle species characterized here could occur also *in vivo* and mediate cytotoxic effects by the formation of ion-permeable pores.

Interestingly, pore formation was significantly inhibited by the compound anle138b, a novel aggregation inhibitor that was characterized by me in regard to pharmacokinetic properties. Anle138b inhibits the aggregation of different disease-specific proteins *in vitro* and is effective in several animal models of neurodegenerative disorders. This suggests that the formation of pores by pathological, disease-specific oligomers could be a common mechanism of neurodegeneration.

Based on a detailed electrophysiological characterization of pathological pores, the present study for the first time describes in detail a novel target structure, which could be used to develop novel disease-modifying therapeutics.

6 Abbildungsverzeichnis

Nr.	Titel	Seite
1.1	Lewy-Körperchen und –Neuriten als histopathologische Charakteristika des Morbus Parkinson	7
1.2	Aminosäuresequenz und räumliche Struktur der <i>full-length</i> Isoform des humanen α -Synucleins	12
1.3	Rasterkraftmikroskopie (AFM)-Aufnahmen von α -Synuclein Oligomeren	18
1.4	Ersatzschaltbild und typische Spannungs-Stromkurven von Plattenkondensatoren	20
1.5	Selbstassemblierung verschiedener Lipide in wässriger Lösung	21
1.6	Kondensatorphysik an Lipid-Doppelschichtmembranen	23
1.7	Dreidimensionale Strukturen porenbildender Bakterien-Toxine	24
2.1	Messaufbau des Insight Readers	32
2.2	2D-FIDA- und SIFT-Methode	36
2.3	Strukturformeln der Aggregationsinhibitoren anle138b, anle138c und Baicalein	37
2.4	Erzeugung von Lipid-Doppelschichtmembranen im Ionovation Compact	40
2.5	Strukturformeln der 3,5-Diphenyl-Pyrazole anle138b, anle138c, anle138d und anle253b	46
3.1	Sequenzierung der aufgereinigten Plasmid-DNA	47
3.2	Typisches Laufprofil nach Elution von der Anionentauschersäule mittels Hochsalzgradient	48
3.3	Coomassie-Blau Färbung der gel-elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen aus der Protein-Elution	49
3.4	Coomassie-Blau Färbung der gel-elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen aus der Gelfiltration	49
3.5	Auswertung des BCA-Assays zur Proteinkonzentrationsbestimmung	50
3.6	MALDI-TOF Massenspektrogramm des aufgereinigten rekombinanten α -Synucleins	51

Nr.	Titel	Seite
3.7	Oligomerbildung und –inhibition in vitro auf Einzelmolekülebene	52
3.8	Typische Spannungs-Stromkurven vor und nach Membranschädigung	53
3.9	Die Porendetektion ist abhängig von der Proteinkonzentration und der Inkubationszeit	55
3.10	Die Erhöhung des Stromflusses über die Membran weist definierte Änderungen auf	56
3.11	Auswertung einer Spannungs-Stromkurve mit charakteristischen Schaltereignissen	56
3.12	Das Auftreten der <i>Steps</i> ist abhängig von der angelegten Spannung	57
3.13	Die Höhe der <i>Steps</i> ist abhängig von der angelegten Spannung	58
3.14	Analyse aller eingenommenen Leitwertlevel und gemessenen <i>Steps</i> bei +80 mV	59
3.15	Analyse eingenommener Leitwertlevel und gemessener <i>Step</i> - Größen in drei repräsentativen Einzelexperimenten	60
3.16	Auftreten von <i>Steps</i> vor und nach Pufferaustausch	61
3.17	<i>Step</i> -Größen in vor und nach Pufferaustausch	62
3.18	Reduktion der Porendetektion durch Co-Inkubation mit Aggregationsinhibitoren	63
3.19	Gewebespiegel von Fe ³⁺ in Gehirn und Serum junger WT-Mäuse	63
4.1	Schematische Darstellung unterschiedlicher Modelle erhöhten Membran-Leitwertes durch Bindung von α -Synuclein Oligomeren	72
4.2	Spannungs-Stromkurven von Membranen mit verschiedenen inserierten Porinen	74

7 Tabellenverzeichnis

Nr.	Titel	Seite
1.1	Gewebespiegel der 3,5-Diphenyl-Pyrazole in jungen WT-Mäusen 4 h nach Applikation via Gavage	64
1.2	Gewebespiegel der 3,5-Diphenyl-Pyrazole in jungen WT-Mäusen 4h nach Applikation in Erdnussbutter	65

8 Literaturverzeichnis

- 1 Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, Dekosky ST, et al. (2010) Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol* 9: 1118-1127.
- 2 Koo EH, Lansbury PT, Jr., Kelly JW (1999) Amyloid diseases: Abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9989-9990.
- 3 Ross CA, Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10: S10-S17.
- 4 Kaye R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, et al. (2003) Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis. *Science* 300: 486-489.
- 5 Glabe CG, Kaye R (2006) Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis. *Neurology* 66: S74-S78.
- 6 Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, et al. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388: 839-840.
- 7 Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998) α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6469-6473.
- 8 Goedert M (2001) Parkinson's disease and other alpha-synucleinopathies. *Clin Chem Lab Med* 39: 308-312.
- 9 Goedert M (2001) Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2: 492-501.
- 10 Kessler II (1978) Parkinson's disease in epidemiologic perspective. *Adv Neurol* 19: 355-384.
- 11 de Rijk MC, Rocca WA, Anderson DW, Melcon MO, Breteler MM, et al. (1997) A population perspective on diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Neurology* 48: 1277-1281.
- 12 de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, et al. (2000) Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology* 54: S21-S23.
- 13 Forman MS, Lee VM, Trojanowski JQ (2005) Nosology of Parkinson's disease: looking for the way out of a quagmire. *Neuron* 47: 479-482.

- 14 von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Bötzel K, Sampaio C, et al. (2005) Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* 15: 473-490.
- 15 Fearnley JM, Lees AJ (1991) Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114: 2283-2301.
- 16 Forno LS (1996) Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 259-272.
- 17 Lang AE, Lozano AM (1998) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 339: 1044-1053.
- 18 Braak H, Sandmann-Keil D, Gai W, Braak E (1999) Extensive axonal Lewy neurites in Parkinson's disease: a novel pathological feature revealed by alpha-synuclein immunocytochemistry. *Neurosci Lett* 265: 67-69.
- 19 Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steuer EN, et al. (1999) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24: 197-211.
- 20 Becker G, Müller A, Braune S, Büttner T, Benecke R, et al. (2002) Early diagnosis of Parkinson's disease. *J Neurol* 249: III:40-48.
- 21 Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ (1983) A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 80: 4546-4550
- 22 Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR, Comyns K, Richards MB, Meng C, Priestley B, Fernandez HH, Cambi F, Umbach DM, Blair A, Sandler DP, Langston JW (2011) Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect.* 119: 866-872
- 23 Gasser T (2003) Overview of the genetics of parkinsonism. *Adv Neurol* 91: 152.
- 24 Gasser T (2007) Update on the genetics of Parkinson's disease. *Mov Disord* 22: S343-350.
- 25 Winklhofer KF, Tazelt J, Haass C (2008) The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *EMBO J* 27: 336-349.
- 26 Krüger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, et al. (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18: 106-108.
- 27 Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, et al. (1997) Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* 276: 2045-2047.

- 28 Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, et al. (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55: 164-173.
- 29 Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Yu I, Shah B, Weir D, Thompson C, Stoessl JA, Farrer MJ (2012) Alpha-synuclein H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 27: S447-S447
- 30 Tolosa E, Wenning G, Poewe W (2006) The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5: 75-86.
- 31 Deuschl G, Schade-Brittinger C, Krack P, Volkmann J, Schafer H, et al. (2006) A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 355: 896-908.
- 32 Lavedan C (1998) The synuclein family. *Genome Res* 8: 871-880.
- 33 Nakajo S, Shioda S, Nakai Y, Nakaya K (1994) Localization of phosphoneuroprotein 14 (PNP 14) and its mRNA expression in rat brain determined by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res* 27: 81-86.
- 34 Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, et al. (1995) The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14: 467-475.
- 35 Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, et al. (1993) Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11282-11286.
- 36 Jakes R, Spillantini MG, Goedert M (1994) Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett* 345: 27-32.
- 37 Ji H, Liu YE, Jia T, Wang M, Liu J, et al. (1997) Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing. *Cancer Res* 57: 759-764.
- 38 Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH (1988) Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 8: 2804-2815.
- 39 Irizarry MC, Kim TW, McNamara M, Tanzi RE, George JM, et al. (1996) Characterization of the precursor protein of the non-A beta component of senile plaques (NACP) in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 889-895.
- 40 Jensen PH, Nielsen MS, Jakes R, Dotti CG, Goedert M (1998) Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation. *J Biol Chem* 273: 26292-26294.

- 41 Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Muller V, Odoj S, et al. (2001) Selective insolubility of alpha-synuclein in human Lewy body diseases is recapitulated in a transgenic mouse model. *Am J Pathol* 159: 2215-2225.
- 42 Beyer K (2006) Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta Neuropathol* 112: 237-251.
- 43 Kahle PJ, Haass C, Kretschmar H, Neumann M (2002) Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related diseases. *J Neurochem* 82: 449-457.
- 44 Uversky VN, Li J, Souillac P, Millett IS, Doniach S, et al. (2002) Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of alpha-synuclein assembly by beta- and gamma-synucleins. *J Biol Chem* 277: 11970-11978.
- 45 Park JY, Lansbury PT, Jr. (2003) Beta-synuclein inhibits formation of alpha-synuclein protofibrils: a possible therapeutic strategy against Parkinson's disease. *Biochemistry* 42: 3696-3700.
- 46 Giese A, Bader B, Bieschke J, Schaffar G, Odoj S, et al. (2005) Single particle detection and characterization of synuclein co-aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 1202-1210.
- 47 Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM (2001) A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem* 276: 2380-2386.
- 48 Tofaris GK, Spillantini MG (2005) Alpha-synuclein dysfunction in Lewy body diseases. *Mov Disord* 20: S37-S44.
- 49 Okochi M, Walter J, Koyama A, Nakajo S, Baba M, et al. (2000) Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. *J Biol Chem* 275: 390-397.
- 50 Pronin AN, Morris AJ, Surguchov A, Benovic JL (2000) Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 275: 26515-26522.
- 51 Uversky VN, Yamin G, Munishkina LA, Karymov MA, Millett IS, et al. (2005) Effects of nitration on the structure and aggregation of alpha-synuclein. *Brain Res Mol Brain Res* 134: 84-102.
- 52 Ostrerova-Golts N, Petrucelli L, Hardy J, Lee JM, Farer M, et al. (2000) The A53T alpha-synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity. *J Neurosci* 20: 6048-6054.
- 53 Uversky VN, Li J, Fink AL (2001) Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J Biol Chem* 276: 44284-44296.

- 54 McLean PJ, Hyman BT (2002) An alternatively spliced form of rodent alpha-synuclein forms intracellular inclusions in vitro: role of the carboxy-terminus in alpha-synuclein aggregation. *Neurosci Lett* 323: 219-223.
- 55 Zakharov SD, Hulleman JD, Dutseva EA, Antonenko YN, Rochet JC, et al. (2007) Helical alpha-synuclein forms highly conductive ion channels. *Biochemistry* 46: 14369-14379.
- 56 Beyer K (2007) Mechanistic aspects of Parkinson's disease: alpha-synuclein and the biomembrane. *Cell Biochem Biophys* 47: 285-299.
- 57 Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, Georger JM (1998) Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem* 273: 9443-9449.
- 58 Uversky VN (2007) Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem* 103: 17-37.
- 59 Högen T, Levin J, Schmidt F, Caruana M, Vasallo N, et al. (2012) Two different binding modes of α -Synuclein to lipid vesicles depending on its aggregation state. *Biophys J* 102.
- 60 McLean PJ, Kawamata H, Ribich S, Hyman BT (2000) Membrane association and protein conformation of alpha-synuclein in intact neurons. Effect of Parkinson's disease-linked mutations. *J Biol Chem* 275: 8812-8816.
- 61 Lee HJ, Choi C, Lee SJ (2002) Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *J Biol Chem* 277: 671-678.
- 62 Nuscher B, Kamp F, Mehnert T, Odoy S, Haass C, et al. (2004) α -Synuclein Has a High Affinity for Packing Defects in a Bilayer Membrane. *J Biol Chem* 279: 21966-21975.
- 63 Kamp F, Beyer K (2006) Binding of alpha-synuclein affects the lipid packing in bilayers of small vesicles. *J Biol Chem* 281: 9251-9259.
- 64 Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, et al. (2000) Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25: 239-252.
- 65 Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VM (2000) Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci* 20: 3214-3220.
- 66 Lee FJ, Liu F, Pristupa ZB, Niznik HB (2001) Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J* 15: 916-926.

- 67 Larsen KE, Schmitz Y, Troyer MD, Mosharov E, Dietrich P, et al. (2006) Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. *J Neurosci* 26: 11915-11922.
- 68 Jenco JM, Rawlingson A, Daniels B, Morris AJ (1998) Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. *Biochemistry* 37: 4901-4909.
- 69 Dev KK, Hofele K, Barbieri S, Buchman VL, van Der PH (2003) Part II: alpha-synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology* 45: 14-44.
- 70 Adams JM, Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326.
- 71 Ostrerova N, Petrucelli L, Farrer M, Mehta N, Choi P, et al. (1999) alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J Neurosci* 19: 5782-5791.
- 72 Leist M, Jäätelä M (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 589-598.
- 73 Recchia A, Debetto P, Negro A, Guidolin D, Skaper SD, et al. (2004) Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *FASEB J* 18: 617-626.
- 74 Chandra S, Gallardo G, Fernandez-Chacon R, Schluter OM, Sudhof TC (2005) Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 123: 383-396.
- 75 Hashimoto M, Hsu LJ, Rockenstein E, Takenouchi T, Mallory M, et al. (2002) alpha-Synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells. *J Biol Chem* 277: 11465-11472.
- 76 Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, et al. (2000) Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 571-576.
- 77 Goldberg MS, Lansbury PT, Jr. (2000) Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat Cell Biol* 2: E115-E119.
- 78 Sanchez I, Mhlke C, Yuan J (2003) Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature* 421: 373-379.
- 79 Fink AL (2006) The Aggregation and Fibrillation of alpha-Synuclein. *Acc Chem Res* 39: 628-634.

- 80 Wood SJ, Wypych J, Steavenson S, Louis JC, Citron M, et al. (1999) alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Biol Chem* 274: 19509-19512.
- 81 Danzer KM, Haasen D, Karow AR, Moussaud S, Habeck M, et al. (2007) Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J Neurosci* 27: 9220-9232.
- 82 Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 101-112.
- 83 Gosavi N, Lee HJ, Lee JS, Patel S, Lee SJ (2002) Golgi Fragmentation Occurs in the Cells with Prefibrillar alpha-Synuclein Aggregates and Precedes the Formation of Fibrillar Inclusion. *J Biol Chem* 277: 48984-48992.
- 84 Kamp F, Exner N, Lutz AK, Wender N, Hegemann J, et al. (2010) Inhibition of mitochondrial fusion by α -synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *EMBO J* 29: 3571-3589.
- 85 Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, Baroni F, Formigli L, et al. (2002) Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 416: 507-511.
- 86 Kostka M, Hogen T, Danzer KM, Levin J, Habeck M, et al. (2008) Single Particle Characterization of Iron-induced Pore-forming α -synuclein Oligomers. *J Biol Chem* 283: 10992-11003.
- 87 Hillmer A, Putcha P, Levin J, Högen T, Hyman BT, et al. (2010) Converse modulation of toxic α -synuclein oligomers in living cells by N'-benzylidene-benzohydrazide derivatives and ferric iron. *Biochem Biophys Res Commun* 391: 461-466.
- 88 Li WJ, Jiang H, Song N, Xie JX (2010) Dose- and time-dependent alpha-synuclein aggregation induced by ferric iron in SK-N-SH cells. *Neurosci Bull* 26: 205-210.
- 89 Hüls S, Högen T, Vasallo N, Danzer K, Hengerer B, et al. (2011) AMPA-receptor mediated excitatory synaptic transmission is enhanced by iron-induced α -synuclein oligomers. *J Neurochem* 117: 868-878.
- 90 Levin J, Högen T, Hillmer A, Bader B, Schmidt F, et al. (2011) Generation of Ferric Iron Links Oxidative Stress to α -Synuclein Oligomer Formation. *Journal of Parkinson's Disease* 1: 205-216.
- 91 Dowhan, W., Bogdanov, M. & Mileykovskaya, E. (2008) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (Elsevier).
- 92 Trump BF, Berezesky IK (1995) Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 9: 219-228

- 93 Sofic E, Riederer P, Heinsen H, Beckmann H, Reynolds GP, et al. (1988) Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J Neural Transm* 74: 199-205.
- 94 Gotz ME, Double K, Gerlach M, Youdim MB, Riederer P (2004) The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1012:193-208.: 193-208.
- 95 Gaeta A, Hider RC (2005) The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy. *Br J Pharmacol* 146: 1041-1059.
- 96 Berg D (2007) Disturbance of iron metabolism as a contributing factor to SN hyperechogenicity in Parkinson's disease: implications for idiopathic and monogenetic forms. *Neurochem Res* 32: 1646-1654.
- 97 Michaeli S, Oz G, Sorce DJ, Garwood M, Ugurbil K, et al. (2007) Assessment of brain iron and neuronal integrity in patients with Parkinson's disease using novel MRI contrasts. *Mov Disord* 22: 334-340.
- 98 Oakley AE, Collingwood JF, Dobson J, Love G, Perrott HR, et al. (2007) Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease. *Neurology* 68: 1820-1825.
- 99 Tofaris GK, Revesz T, Jacques TS, Papacostas S, Chataway J (2007) Adult-onset neurodegeneration with brain iron accumulation and cortical alpha-synuclein and tau pathology: a distinct clinicopathological entity. *Arch Neurol* 64: 280-282.
- 100 Ben-Shachar D, Eshel G, Riederer P, Youdim MB (1992) Role of iron and iron chelation in dopaminergic-induced neurodegeneration: implication for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 32 Suppl:S105-10.: S105-S110.
- 101 Kaur D, Yantiri F, Rajagopalan S, Kumar J, Mo JQ, Boonplueang R, Viswanath V, Jacobs R, Yang L, Beal MF, Di Monte DA, Volitaskis I, Ellerby L, Cherny RA, Bush AI, Andersen JK (2003) Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease. *Neuron*. 37: 899-909
- 102 Shachar DB, Kahana N, Kampel V, Warshawsky A, Youdim MB (2004) Neuroprotection by a novel brain permeable iron chelator, VK-28, against 6-hydroxydopamine lesion in rats. *Neuropharmacology* 46: 254-263.
- 103 Youdim MB, Stephenson G, Ben-Shachar D (2004) Ironing iron out in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases with iron chelators: a lesson from 6-hydroxydopamine and iron chelators, desferal and VK-28. *Ann N Y Acad Sci* 1012: 306-325.
- 104 Zhang X, Xie W, Qu S, Pan T, Wang X, et al. (2005) Neuroprotection by iron chelator against proteasome inhibitor-induced nigral degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 544-549.

- 105 Paik SR, Shin HJ, Lee JH, Chang CS, Kim J (1999) Copper(II)-induced self-oligomerization of alpha-synuclein. *Biochem J* 340: 821-828.
- 106 Tanaka Y, Engelender S, Igarashi S, Rao RK, Wanner T, et al. (2001) Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet* 10: 919-926.
- 107 Lindersson E, Beedholm R, Hojrup P, Moos T, Gai W, et al. (2004) Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. *J Biol Chem* 279: 12924-12934.
- 108 Volles MJ, Lee SJ, Rochet JC, Shtilerman MD, Ding TT, et al. (2001) Vesicle Permeabilization by Protofibrillar α -Synuclein: Implications for the Pathogenesis and Treatment of Parkinson's Disease. *Biochemistry* 40: 7812-7819.
- 109 Lashuel HA, Hartley D, Petre BM, Walz T, Lansbury PT, Jr. (2002) Neurodegenerative disease: Amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* 418: 291.
- 110 Volles MJ, Lansbury PT (2002) Vesicle Permeabilization by Protofibrillar α -Synuclein is Sensitive to Parkinson's Disease-linked Mutations and Occurs by a Pore-like Mechanism. *Biochemistry* 41: 4595-4602.
- 111 Lashuel HA, Petre BM, Wall J, Simon M, Nowak RJ, et al. (2002) alpha-Synuclein, Especially the Parkinson's Disease-associated Mutants, Forms Pore-like Annular and Tubular Protofibrils. *J Mol Biol* 322: 1089-1102.
- 112 Kaye R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, et al. (2004) Permeabilization of Lipid Bilayers is a Common Conformation-dependent Activity of Soluble Amyloid Oligomers in Protein Misfolding Diseases. *J Biol Chem* 279: 46363-46366.
- 113 Quist A, Doudevski I, Lin H, Azimova R, Ng D, et al. (2005) Amyloid ion channels: A common structural link for protein-misfolding disease. *Proc Natl Acad Sci* 102: 10427-10432.
- 114 Lashuel HA, Lansbury PT, Jr. (2006) Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins? *Q Rev Biophys* 39: 167-201.
- 115 Lashuel HA, Hartley DM, Petre BM, Wall JS, Simon MN, et al. (2003) Mixtures of Wild-type and a Pathogenic (E22G) Form of Ab40 in Vitro Accumulate Protofibrils, Including Amyloid Pores. *J Mol Biol* 332: 795-808.
- 116 Kaye R, Glabe CG (2004) Formation, stability and toxicity of annular protofibrils from different amyloid forming proteins. *Neurobiol Aging* 25: 144.
- 117 Kawahara M, Ohtsuka I, Yokoyama S, Kato-Negishi M, Sadakane Y (2011) Membrane Incorporation, Channel Formation, and Disruption of Calcium Homeostasis by Alzheimer's b-Amyloid Protein. *Int J Alzheimers Dis* 2011.

- 118 Caruana M, Neuner J, Högen T, Schmidt F, Kamp F, et al. (2012) Polyphenolic compounds are novel protective agents against lipid membrane damage by α -synuclein aggregates *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 1818: 2502-2510.
- 119 Sharon A, Bar-Joseph I, Frosch MP, Walsh DM, Hamilton JA, et al. (2003) The formation of highly soluble oligomers of alpha-synuclein is regulated by fatty acids and enhanced in Parkinson's disease. *Neuron* 37: 583-595.
- 120 Pountney DL, Lowe R, Quilty M, Vickers JC, Voelcker NH, et al. (2004) Annular alpha-synuclein species from purified multiple system atrophy inclusions. *J Neurochem* 90: 502-512.
- 121 El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Curran MD, Gibson MJ, et al. (2006) Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 20: 419-425.
- 122 Crompton M (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341: 233-249.
- 123 van Rooijen BD, Claessens MMAE, Subramaniam V (2010) Membrane Permeabilization by Oligomeric α -Synuclein: In Search of the Mechanism. *PLoS ONE* 5: e14292.
- 124 Reynolds NP, Soragni A, Rabe M, Verdes D, Liverani E, et al. (2011) Mechanism of Membrane Interaction and Disruption by α -Synuclein. *J Am Chem Soc* 133: 19366-19375.
- 125 Hodgkin AL, Huxley AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.* 117: 500-544
- 126 Hanke, W. & Hanke, R. (1997) *Methoden der Membranphysiologie* (Spektrum Akademischer Verlag).
- 127 Adam, G., Laeuger, P. & Stark, G. (2007) *Physikalische Chemie und Biophysik* (Springer Verlag).
- 128 Small, D. M. (1986) *The Physical Chemistry of Lipids: from Alkanes to Phospholipids* (Plenum Press).
- 129 Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Wescott WC (1962) Reconstitution of cell membrane structure *in vitro* and its transformation into an excitable system. *Nature* 194: 979-980.
- 130 Montal M, Mueller P (1972) Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 3561-3566.
- 131 White S (1972) Analysis of the torus surrounding planar lipid bilayer membranes. *Biophys J* 12: 432-445.
- 132 Tien HT, Carbone S, Dawidowicz EA (1966) Formation of "Black" Lipid Membranes by Oxidation Products of Cholesterol. *Nature* 212: 718-719.

- 133 Wallace BA (1990) Gramicidin Channels and Pores. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 19: 127-157.
- 134 Lundbaek JA, Collingwood SA, Ingólfsson HI, Kapoor R, Andersen OS (2010) Lipid bilayer regulation of membrane protein function: gramicidin channels as molecular force probes. *J R Soc Interface* 7: 373-395.
- 135 Kraslinikov OV, Sabirov RZ, Ternovsky VI, Merzliak PG, Tashmukhamedov BA (1988) The structure of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin-induced ionic channel. *Gen Physiol Biophys* 7: 467-473.
- 136 Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, et al. (1996) Structure of Staphylococcal alpha-Hemolysin, a Hemptameric Transmembrane Pore. *Science* 274: 1859-1866.
- 137 Wimley WC (2003) The versatile beta-barrel membrane protein. *Curr Opin Struct Biol* 13: 404-411.
- 138 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 139 Bradford MM (1975) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- 140 Renart J, Reiser J, Stark GR (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci* 76: 3116-3120.
- 141 Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, et al. (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.
- 142 Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F (1987) Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 78: 53-68.
- 143 Schwille P, Meyer-Almes FJ, Rigler R (1997) Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys J* 72: 1878-1886.
- 144 Schwille P, Bieschke J, Oehlenschläger F (1997) Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: the analytical and diagnostic potential of diffusion studies. *Biophys Chem* 66: 211-228.
- 145 Kask P, Palo K, Ullmann D, Gall K (1999) Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13756-13761.
- 146 Bieschke J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Poser S, et al. (2000) Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5468-5473.

- 147 Kask P, Palo K, Fay N, Brand L, Mets U, et al. (2000) Two-dimensional fluorescence intensity distribution analysis: theory and applications. *Biophys J* 78: 1703-1713.
- 148 Giese A, Bieschke J, Eigen M, Kretzschmar HA (2000) Putting prions into focus: application of single molecule detection to the diagnosis of prion diseases. *Arch Virol Suppl* 161-171.
- 149 Bacia K, Schwille P (2003) A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy. *Methods* 29: 74-85.
- 150 Giese A, Levin J, Bertsch U, Kretzschmar H (2004) Effect of metal ions on de novo aggregation of full-length prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 1240-1246.
- 151 Giese, A., Bertsch, U., Wagner, J., Habeck, M., Weber, F., Kretzschmar, H., Hirschberger, M., Tavan, P., Geissen, M., Groschup, M. *et al.* New drugs for inhibiting aggregation of proteins involved in diseases linked to protein aggregation and/or neurodegenerative diseases. EP 08 01 0458.1, PCT/EP2009/004144, WO2010/000372A2, ZA-Patent 2010/8820. 2010.
- 152 Wagner J, Ryazanov S, Leonov A, Levin J, Shi S, et al. (2013) Anle138b: A novel oligomer modulator for the treatment of prion and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 125: 795-813.
- 153 Zhu M, Rajamani S, Kaylor J, Han S, Zhou F, et al. (2004) The flavonoid baicalein inhibits fibrillation of alpha-synuclein and disaggregates existing fibrils. *J Biol Chem* 279: 26846-26857.
- 154 Hemmler R, Böse G, Wagner R, Peters R (2005) Nanopore Unitary Permeability Measured by Electrochemical and Optical Single Transporter Recording. *Biophys J* 88: 4000-4007.
- 155 Palay SL, McGee-Russell SM, Gordon SJ, Grillo MA (1962) Fixation of neural tissues for electron microscopy by perfusion with solutions of osmium tetroxide. *J Cell Biol* 12: 385-410.
- 156 Ahlfeld J, Mustari M, Horn AK (2011) Sources of calretinin inputs to motoneurons of extraocular muscles involved in upgaze. *Ann N Y Acad Sci* 1233: 91-99.
- 157 Bernas B (1968) New method for decomposition and comprehensive analysis of silicates by atomic absorption spectrometry. *Anal Chem* 40: 1682-1686.
- 158 Kotz L, Kaiser G, Tschöpel P, Tölg G (1972) Aufschluß biologischer Matrices für die Bestimmung sehr niedriger Spurenelementgehalte bei begrenzter Einwaage mit Salpetersäure unter Druck in einem Teflongefäß. *Fresenius Z Anal Chem* 260: 207-209.
- 159 Schramel P, Wolf A, Seif R, Klose B-J (1980) Eine neue Apparatur zur Druckveraschung von biologischem Material. *Fresenius Z Anal Chem* 302: 62-64.

- 160 Knapp G (1984) Der Weg zu leistungsfähigen Methoden der Elementspurenanalyse in Umweltproben. *Fresenius Z Anal Chem* 317: 213-219.
- 161 Houk RS, Fassel VA, Flesch GD, Svec HJ, Gray AL, et al. (1980) Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements. *Anal Chem* 52: 2283-2289.
- 162 Chicz RM, Regnier FE (1990) High-performance liquid chromatography: effective protein purification by various chromatographic modes. *Methods Enzymol.* 182: 392-421
- 163 Poirier MA, Li H, Macosko J, Cai S, Amzel M, Ross CA (2002) Huntingtin spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrilization. *J.Biol.Chem.* 277: 41032-41037
- 164 Pitschke M, Prior R, Haupt M, Riesner D (1998) Detection of single amyloid beta-protein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy. *Nat.Med.* 4: 832-834
- 165 Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, et al. (2000) Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287: 1265-1269.
- 166 Volles MJ, Lansbury PT (2003) Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry.* 42: 7871-7878
- 167 Kourie JI (2002) Prion channel proteins and their role in vacuolation and neurodegenerative diseases. *Eur Biophys J.* 31: 409-416
- 168 Melikov KC, Frolov VA, Shcherbakov A, Samsonov AV, Chizmadzhev YA, et al. (2001) Voltage-Induced Nonconductive Pre-Pores and Metastable Single Pores in Unmodified Planar Lipid Bilayer. *Biophys J* 80: 1829-1836.
- 169 Gambale F, Menini A, Rauch G (1987) Effects of calcium on the gramicidin A single channel in phosphatidylserine membranes. Screening and blocking. *Eur Biophys J* 14: 369-374.
- 170 Schindler H, Rosenbusch JP (1978) Matrix protein from *Escherichia coli* outer membranes forms voltage-controlled channels in lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 3751-3755.
- 171 Benz R, Schmid A, Hancock REW (1985) Ion Selectivity of Gram-Negative Bacterial Porins. *J Bacteriol* 162: 722-727.
- 172 Lakey JH, Watts JP, Lea EJA (1985) Characterization of channels induced in planar bilayer membranes by detergent solubilised *Escherichia coli* porins. *Biochim Biophys Acta* 817: 208-216.
- 173 Catterall W (1988) Structure and Function of Voltage-Sensitive Ion Channels. *Science* 242: 50-61.

- 174 Delcour AH (1997) Function and modulation of bacterial porins: insights from electrophysiology. FEMS Microbiol Lett 151: 115-123.
- 175 Meuser D, Splitt H, Wagner R, Schrempf H (1999) Exploring the open pore of the potassium channel from *Streptomyces lividans*. FEBS Lett 462: 447-452.
- 176 Brunen M, Engelhardt H (1993) Asymmetry of orientation and voltage gating of the *Acidovorax delafieldii* porin Omp34 in lipid bilayers. Eur J Biochem 212: 129-135.
- 177 Benz R, Schmid A, Wagner W, Goebel W (1989) Pore Formation by the *Escherichia coli* Hemolysin: Evidence for an Association-Dissociation Equilibrium of the Pore-Forming Aggregates. Infect Immun 57: 887-895.
- 178 Petronilli V, Szabo I, Zoratti M (1989) The inner mitochondrial membrane contains ion-conducting channels similar to those found in bacteria. FEBS Lett 259: 137-143.
- 179 Tong J, Wong H, Guttman M, Ang LC, Forno LS, et al. (2010) Brain alpha-synuclein accumulation in multiple system atrophy, Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy: a comparative investigation. Brain 133: 172-188.
- 180 Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Muller V, Jacobsen H, et al. (2000) Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein in human and transgenic mouse brain. J Neurosci 20: 6365-6373.
- 181 Neumann M, Kahle PJ, Giasson BI, Ozmen L, Borroni E, et al. (2002) Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated alpha-synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human alpha-synucleinopathies. J Clin Invest 110: 1429-1439.
- 182 Freichel C, Neumann M, Ballard T, Muller V, Woolley M, et al. (2007) Age-dependent cognitive decline and amygdala pathology in alpha-synuclein transgenic mice. Neurobiol Aging 28: 1421-1435.
- 183 Frick A, Grammel D, Schmidt F, Pöschel J, Priller M, et al. (2012) Proper cerebellar development requires expression of b1-integrin in Bergmann glia, but not in granule neurons. Glia 60: 820-832.
- 184 Levin J, Schmidt F, Boehm C, Prix C, Bötzel K, et al. (2014) The oligomer modulator anle138b inhibits disease progression in a Parkinson mouse model even with treatment started after disease onset. Acta Neuropathol. 2014 Mar 11. [Epub ahead of print]

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt den Betreuern dieser Arbeit, Kai Bötzel, Karl-Siegfried Boos, Armin Giese und Johannes Levin, die mich dieses spannende Thema mit allen nur erdenklichen Freiheiten bearbeiten ließen, mir während der gesamten Arbeit geduldig zur Seite standen und mir auch immer die Möglichkeit gegeben haben, meine Fühler in die vielen anderen spannenden Projekte auszustrecken. Hier hatte auch der „bergsteigende, motorradfahrende Rock’n’Roll-Wissenschaftler“ einen Platz im Labor. Vielen Dank!

Für die tägliche Unterstützung im Laboralltag danke ich Tobi Högen, Jens Wagner, Song Shi, Frits Kamp und Janina Mielke. Für ihren weit darüber hinaus weisenden Beitrag zur rhythmischen Abend- und Wochenendgestaltung, sowie zu meinem Leben danke ich Catharina Prix, Martin Bartels, Georg Nübling, Sonja Steinbach, Johanna Neuner, Sonja Blumenstock, Markus Priller und Julia Ahlfeld. Ohne euch hätte das Ganze nicht halb so viel Spaß gemacht, danke.

Für die jahrelange Begleitung außerhalb des Labors danke ich Alexandra Bartel. Danke, dass du diesen Weg so lange mit mir zusammen gegangen bist.

Uschi Schmidt danke ich dafür, dass sie mir die wichtigsten Lektionen des wissenschaftlichen Arbeitens und des Lebens beigebracht und vorgelebt hat: „Tu, was getan werden muss, und mach es so gut wie du kannst.“ und „Du kannst nicht die ganze Welt retten, aber du musst es wenigstens versuchen.“

Eidesstattliche Versicherung

Felix Mathias Schmidt

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Toxische Oligomere in der Pathogenese des Morbus Parkinson -
Elektrophysiologische Charakterisierung der Membraninteraktion und Porenbildung
von pathologischen α -Synuclein Aggregaten

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient
und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen
sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der
Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder
in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen
Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand